UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (NEMATODA, STRONGYLIDAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PELA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DO DNA (RAPD).

ANTONIO NASCIMENTO DUARTE

T
595.182
D812d

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

SETEMBRO, 1998.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (NEMATODA, STRONGYLIDAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PELA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DO DNA (RAPD).

ANTONIO NASCIMENTO DUARTE

Aprovada em 30 / 09 / 98.

Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues

Dra. Rosângela Rodrigues e Silva

Dra. Cláudia Maria Leal Bevilaqua

Dr. Luíz Fernando Ferreira

Dr. Alexandre Ribeiro Bello

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (NEMATODA, STRONGYLIDAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PELA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DO DNA (RAPD).

ANTONIO NASCIMENTO DUARTE

SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA

Dra. MARIA DE LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau *de Philosophie Doctor* em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

SETEMBRO, 1998.

A meu pai (*in memoriam*), minha mãe e meus irmãos, por me servirem de espelho.

À minha companheira Elaine, com amor, por seu significado. Aos nossos filhos, Gabriel, Carolina e Bernard, por nos ajudarem na nossa caminhada.

Ao Sérgio e à Cida, amigos e sogros, com carinho.

Saúda o teu dia com a oração de reconhecimento.

Tu estás vivo.

Enquanto a vida se expressa, multiplicam-se as oportunidades de crescer e ser feliz.

Cada dia é uma benção nova que Deus te concede, dando-te prova de amor.

Acompanha a sucessão das horas cultivando otimismo e bem–estar.

(Joanna de Ângelis)

AGRADECIMENTOS

Aos Drs Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, Alexandre Ribeiro Bello e Luíz Fernando Rocha Ferreira da Silva pela amizade e orientação deste trabalho.

Ao Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo pelo exemplo e estímulo profissional, também por possibilitar o apoio material a este trabalho.

Aos profissionais da Disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM – UERJ). Em especial aos Drs José Roberto Machado e Silva e Hércules de Moura, pelo incentivo e críticas. Aos Drs Lúcia Maria de Oliveira, Robson de Jesus Reis do Nascimento, Lêda Maria da Costa Macêdo e Octávio Fernandes da Silva. À Érika Veríssimo Villela, Yára Gouveia, Robson Pereira Alves, Sidnei da Silva, Regina Maria Figueiredo de Oliveira, Marilene Adão de Paula, Fátima Haddad Machado e Fátima Bastos Martins pelo estímulo, colaboração, e companheirismo no transcorrer do nosso convívio diário.

Aos Profs Elena Mettifogo e Milton Yamamura da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Fábio Barbour Scott e Katherina Coumendouros da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), aos técnicos da Estação Experimental de Parasitologia W. O. Neitz da UFRRJ e do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura (SIF-PR). Também aos proprietários do Frigorífico King Meat S/A (Londrina – Paraná), por facultarem a obtenção dos nematóides utilizados neste estudo.

Ao meu sobrinho Jean de Queiroz Duarte, matemático e dublê de Parasitologista, pela ajuda na montagem e identificação dos helmintos.

Ao Dr. Nicolau Maués da Serra Freire do Laboratório de Ixodídeos do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, por facultar-me o acesso aos eqüinos examinados neste trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo Winter da Universidade de São Paulo (USP) pelo fornecimento de DNA genômico do nematóide *Caenorhabidits elegans*.

À Profª Gisele Lôbo Hajdu do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) – UERJ, pela indispensável orientação na aplicação dos programas de análise genética, utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Rodolpho Albano do IBRAG – UERJ, pelo fornecimento de algumas das seqüências iniciadoras aplicadas neste estudo.

À Doutoranda Débora Henriques S. dos Anjos (UFRRJ), pela determinação e fornecimento dos espécimes de ciatostomíneos estudados.

Aos companheiros Natalina Jordão de Oliveira, Paulo César Martins e Marcus Vinícius da Costa do Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP – FIOCRUZ) pela amizade.

Aos amigos Maria Nair Caldeira Rodrigues, Maria Carla Rodrigues de Oliveira e Francisco Gutemberg de Lucena da secretaria do Departamento de Endemias da ENSP pela competência, presteza e apoio sempre demonstrados.

Aos professores, secretários e técnicos do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela dedicação, paciência e por seus ensinamentos. Aos colegas de curso pelo convívio amistoso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por financiarem parte deste trabalho.

Agradeço sinceramente às instituições e às pessoas com quem eu pude contar em todas as etapas de realização deste trabalho e que por ventura não tenham sido citadas.

BIOGRAFIA

Antonio Nascimento Duarte, filho de Domingos Gomes Duarte e Esmeralda Nascimento Duarte, nasceu a 21 de julho de 1963 no Povoado da Barra, Município de Caravelas, Estado da Bahia. Em 1970, transferiu-se com a família para o Estado do Rio de Janeiro, fixando residência em Duque de Caxias, onde no período de 1971 a 1978 realizou o Curso Fundamental nas Escolas Municipal José Elisa Lyra (1ª a 4ª série) e Estadual Irineu Marinho (5ª a 8ª série).

Profissionalizou-se em Auxiliar de Patologia Clínica no Centro Educacional São José no ano de 1981. Em março de 1982 ingressou no Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), concluindo-o em 1983. Neste ano iniciou o curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Faculdade de Humanidades Pedro II (FAHUPE), no Município do Rio de Janeiro, onde graduou-se em 1987.

Iniciou sua experiência profissional em maio de 1981 no Laboratório de Análises Clínicas Rutex, como Técnico de Laboratório. Em março de 1985, foi selecionado, por concurso interno, para ocupar o cargo de Auxiliar de Serviços de Pesquisa no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ). No mesmo ano transferiu-se para o Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP / FIOCRUZ) onde após ocupar os cargos de Auxiliar Técnico e de Técnico de Pesquisa, ascendeu em 1990 ao quadro de nível superior como Pesquisador Auxiliar. Atualmente é Pesquisador Adjunto do Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP.

Em 1991, iniciou o Curso de Pós-graduação, a nível de Mestrado, em Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Concluindo-o em fevereiro de 1994, com a defesa da tese intitulada:. **"Estudo Paleoparasitológico em Coprólitos do Sítio Arqueológico da Furna do Estrago, Município do Brejo da Madre de Deus, Pernambuco – Brasil"**. Em março daquele ano ingressou para o doutoramento no referido curso.

Iniciou sua experiência profissional em maio de 1981 no Laboratório de Análises Clínicas Rutex, como Técnico de Laboratório. Em março de 1985, foi selecionado, por concurso interno, para ocupar o cargo de Auxiliar de Serviços de Pesquisa no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ). No mesmo ano transferiu-se para o Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP / FIOCRUZ) onde após ocupar os cargos de Auxiliar Técnico e de Técnico de Pesquisa, ascendeu em 1990 ao quadro de nível superior como Pesquisador Auxiliar. Atualmente é Pesquisador Adjunto do Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP.

Em 1991, iniciou o Curso de Pós-graduação, a nível de Mestrado, em Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Concluindo-o em fevereiro de 1994, com a defesa da tese intitulada:. **"Estudo Paleoparasitológico em Coprólitos do Sítio Arqueológico da Furna do Estrago, Município do Brejo da Madre de Deus, Pernambuco – Brasil"**. Em março daquele ano ingressou para o doutoramento no referido curso.

SUMÁRIO

Pág.

1 – Introdução..... 1

2 – Revisão de Literatura..... 5

2.1 - Limitações do diagnóstico parasitológico e perspectivas de diagnóstico através dos ácidos nucléicos..... 5

2.2 – Estudos moleculares diferenciais e aplicabilidade das metodologias no diagnóstico dos parasitos..... 8

3 – Material e Métodos..... 20

3.1 - Locais de realização dos experimentos..... 20

3.2 - Obtenção de parasitos adultos..... 21

3.3 - Identificação dos parasitos adultos..... 21

3.4 - Contagem de ovos e cultivo de larvas de terceiro estágio (L_3)..... 21

Pág.

3.5 - Identificação das larvas (L_3) obtidas em cultivos..... 22

3.6 - Extração de DNA genômico..... 22

3.7 - Purificação dos extratos de DNA genômico..... 24

3.8 - Eletroforese dos extratos de DNA genômico em mini - gel de agarose a 1%..... 24

3.9 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... 25

3.10- Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 1,5%..... 27

3.11- Cálculo dos pesos moleculares dos produtos de PCR..... 27

3.12- Análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)..... 28

3.12.1 - Escolha dos "primers" aleatórios..... 28

3.12.2 - Protocolo de RAPD..... 29

3.13- Eletroforese dos produtos de RAPD em gel de poliacrilamida:..... 30

3.14- Análise computacional das correlações genéticas das amostras... 31

4 – Resultados e Discussão..... 32

5 – Conclusões..... 51

6 – Referências Bibliográficas..... 53

7 – Anexos..... 68

7.1 - Resultados dos exames dos equídeos (OPGs e Coproculturas).... 68

7.2 - Técnica de extração do DNA genômico..... 69

Pág.

7.3 - Eletroforese em mini-gel de agarose a 1%..... 72

7.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%..... 74

7.5 - Coloração de DNA em gel de poliacrilamida a 6% pela prata Amoniacal..... 77

7.6 – Técnica de secagem do gel de poliacrilamida..... 79

7.7 - Fórmulas das soluções utilizadas..... 80

7.7.1 - Mini - gel de Agarose a1%..... 80

7.7.2 - Tampão de carregamento ("Loading Buffer" 6X)..... 81

7.7.3 - Tampão Tris – Borato – EDTA / TBE pH 8.3 (Solução estoque / 5X concentrada)..... 81

7.7.4 - Solução Tris 10 mM / EDTA 1 mM pH 7.5 (Estoque 10X concentrada)..... 82

7.7.5 - Solução de Nitrato de Prata Amoniacal..... 82

7.7.6 - Solução de secagem do gel de poliacrilamida..... 82

8- Apêndice - Artigo: "A. N. DUARTE; M. L. A. RODRIGUES; A. R. BELLO; H. MOURA & L. F. FERREIRA - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (STRONGYLOIDEA: STRONGYLINAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) - **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 6 (1): 39 – 43, 1997. 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose a 1% corado pelo Brometo de etídeo: A – Marcador de peso molecular λ DNA / *Eco* RI; B – *Ascaridia numidae*; C – *Schistosoma mansoni*; D – L_3 de Cyathostominae; E – *Strongylus edentatus*; F – *Strongylus equinus*; G – *Strongylus vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases..... 44

Figura 2 - Eletroforese de produtos de PCR em gel de agarose a 1,5% corado pelo Brometo de etídeo: A – Marcador de peso molecular ϕ x 174 RF DNA / *Hae III*; B – *Ascaridia numidae*; C – *Schistosoma mansoni*; D - L_3 de Cyathostominae; E – *Strongylus edentatus*; F - *Strongylus equinus*; G – *Strongylus vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases..... 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose a 1% corado pelo Brometo de etídeo: A – Marcador de peso molecular λ DNA / *Eco* RI; B – *Ascaridia numidae*; C – *Schistosoma mansoni*; D – L_3 de Cyathostominae; E – *Strongylus edentatus*; F – *Strongylus equinus*; G – *Strongylus vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases..... 44

Figura 2 - Eletroforese de produtos de PCR em gel de agarose a 1,5% corado pelo Brometo de etídeo: A – Marcador de peso molecular ϕ x 174 RF DNA / *Hae III*; B – *Ascaridia numidae*; C – *Schistosoma mansoni*; D - L_3 de Cyathostominae; E – *Strongylus edentatus*; F - *Strongylus equinus*; G – *Strongylus vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases..... 45

Pág.

Figura 3 – Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 3 – OPG – 18**): A- *Strongylus edentatus*; B – *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G – Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 46

Figura 4 – Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 4 – OPG – 19**): A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G – Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 47

Figura 5 - Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 5 – UNB – 63**): A- *Strongylus edentatus*; B – *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G - Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 48

Pág.

Figura 3 – Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 3 – OPG – 18**): A- *Strongylus edentatus*; B – *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G – Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 46

Figura 4 – Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 4 – OPG – 19**): A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G – Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 47

Figura 5 - Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**primer 5 – UNB – 63**): A- *Strongylus edentatus*; B – *Strongylus equinus*; C – *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F – *Caenorhabditis elegans*; G - Controle negativo; H – Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB – Pares de bases..... 48

Pág.

Figura 6 - Matriz das distâncias entre os DNAs das amostras, obtida através dos produtos de RAPD analisados em gel de poliacrilamida 6%. A - *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C - *Strongylus vulgaris*, D – *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*... 49

Figura 7 - Fenograma baseado nas distâncias entre os DNAs das amostras, baseado na análise por UPGMA dos produtos de RAPD analisados em gel de poliacrilamida 6%. A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C - *Strongylus vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*..... 50

ÍNDICE DE QUADROS

Pág.

Quadro 1 - Especificações dos "primers" utilizados nas reações de RAPD... 42

Quadro 2 – Qualidade das amplificações e Quantidade de amostras amplificadas pelos "primers" nas reações de RAPD. Análise em gel de poliacrilamida a 6%..... 43

RESUMO

O presente estudo busca ampliar as observações sobre os materiais nucléicos de *Strongylus spp.*, comparando-os aos de organismos filogeneticamente próximos, contribuindo assim para a eliminação de possíveis dúvidas no diagnóstico molecular das espécies em questão. Além disto, criar suporte que possibilite o diagnóstico de seus ovos e larvas nas fezes na pastagem.

Através da PCR do segmento ITS-2, obtivemos produtos com 372, 372 e 357 pares de bases (pb), respectivamente para as amostras oriundas de *Strongylus edentatus*, *S. equinus* e *S. vulgaris*, conforme demonstrados anteriormente em estrongilídeos estudados na Austrália.

Nossos dados ampliaram as informações ao demonstrarem a presença de bandas com peso molecular de 428 pb em produtos de larvas de Cyathostominae

RESUMO

O presente estudo busca ampliar as observações sobre os materiais nucléicos de *Strongylus spp.*, comparando-os aos de organismos filogeneticamente próximos, contribuindo assim para a eliminação de possíveis dúvidas no diagnóstico molecular das espécies em questão. Além disto, criar suporte que possibilite o diagnóstico de seus ovos e larvas nas fezes na pastagem.

Através da PCR do segmento ITS-2, obtivemos produtos com 372, 372 e 357 pares de bases (pb), respectivamente para as amostras oriundas de *Strongylus edentatus*, *S. equinus* e *S. vulgaris*, conforme demonstrados anteriormente em estrongilídeos estudados na Austrália.

Nossos dados ampliaram as informações ao demonstrarem a presença de bandas com peso molecular de 428 pb em produtos de larvas de Cyathostominae

e de adultos de *Triodontophorus sp.*, e a ausência de amplificação em *Schistosoma mansoni* e *Ascaridia numidae*, incluídos como controles negativos. Obtivemos amplificação do DNA genômico de *Caenorhabditis elegans* (controle positivo), com peso molecular de 524 pb o que demonstra a confiabilidade dos resultados. Também foram incluídos DNAs dos ciatostomíneos: *Cyathostomum sp.*, *Cyliclocyclus sp.*, *Cylicostephanus sp.*, *Coronocephalus sp.*, *Gyalocephalus sp.*, dos quais não obtivemos amplificações possivelmente devido às baixas concentrações de DNA genômico obtidas nas extrações.

Conforme previamente descrito, às mínimas variações dos pesos moleculares dos produtos amplificados a partir de *Strongylus spp* não permitiu a determinação espécie – específica direta. O que implicou, em adição, no emprego da análise do polimorfismo dos produtos de amplificação com "primers" aleatórios (RAPD), que forneceu padrões eletromórficos confiáveis para diferenciação das espécies estudadas. Ainda, a partir destes padrões de amplificação obtivemos uma matriz de similaridade e um fenograma que contribuíram na formulação de inferências filogenéticas acerca dos organismos estudados.

SUMMARY

The current investigation extended the scope of the observations associated with the second internal transcribed spacer (ITS-2) from *Strongylus* spp., establishing comparisons with the amplified products from phylogenetically related organisms. It also presented data suggesting methodology for the proper detection of eggs and larvae in the fields, eliminating thus uncertainties in the molecular diagnostic of these parasites.

We obtained ITS-2 PCR products with 372 base pairs (bp), 372 bp and 357 bp for *Strongylus* edentatus, *S. equinus* and *S. vulgaris*, respectively from Seropédica, Rio de Janeiro and Londrina, Paraná, in close agreement with what was observed for this genus in Australian parasites.

We also expanded the previous information on this subject by demonstrating ITS-2 amplified bands (428 bp) for Cyathostominae larvae, and adult worms of *Triodontophorus* sp. On the other hand, the presence of a band

with 524 bp, as the result of the amplification of genomic DNA from *Caenorhabditis elegans* (positive control), reinforced the reliability of the results.

The outgroups, *Schistosoma mansoni* and *Ascaridia numidae*, did not display any amplified products. Besides, no amplifications were observed either for the following Cyathostominae: *Cyathostomum* sp., *Cyliclocylus* sp., *Cylicostephanus* sp., *Coronocephalus* sp. and *Gyalocephalus* sp., possibly due to the low amount of genomic DNA used in the experiments.

As already previously described, the molecular weight size range observed for the *Strongylus* spp. parasites did not allow direct species-specific determination, an issue to be approached with the use of restriction enzymes (RFLP-PCR).

The utilization of random primers resulted in reliable and diagnostic (species-specific) amplification patterns that were used for the construction of similarity matrix and phenogram. These data permitted us to make further inferences about the phylogenetical relatedness of the organisms used in this study.

with 524 bp, as the result of the amplification of genomic DNA from *Caenorhabditis elegans* (positive control), reinforced the reliability of the results.

The outgroups, *Schistosoma mansoni* and *Ascaridia numidae*, did not display any amplified products. Besides, no amplifications were observed either for the following Cyathostominae: *Cyathostomum* sp., *Cyliclocylus* sp., *Cylicostephanus* sp., *Coronocephalus* sp. and *Gyalocephalus* sp., possibly due to the low amount of genomic DNA used in the experiments.

As already previously described, the molecular weight size range observed for the *Strongylus* spp. parasites did not allow direct species-specific determination, an issue to be approached with the use of restriction enzymes (RFLP-PCR).

The utilization of random primers resulted in reliable and diagnostic (species-specific) amplification patterns that were used for the construction of similarity matrix and phenogram. These data permitted us to make further inferences about the phylogenetical relatedness of the organisms used in this study.

INTRODUÇÃO

Nematóides pertencentes a família Strongylidae são parasitos de cavalos e outros eqüídeos. Cerca de 56 espécies desta família são citadas para estes hospedeiros. Os gêneros *Strongylus* Mueller,1780 (com as espécies *S. vulgaris, S. edentatus*, *S. equinus* e *S. asini*), *Oesophagodontus* Giles,1892, *Triodontophorus* Looss, 1902 e *Craterostomum* Boulenger, 1920 estão compreendidos na sub-família Strongylinae. A sub–família Cyathostominae reúne 44 espécies nos 10 seguintes gêneros: *Caballonema* Abuladze, 1937; *Cylindropharynx* Leiper, 1911; *Cylicocyclus* Ihle, 1922; *Cylicodontophorus* Ihle, 1922; *Petrovinema* Ershov, 1943; *Coronocyclus* Hartwich, 1936; *Cylicostephanus* Ihle, 1922; *Poteriostomum* Quiel, 1919; *Parapoteriostomum* Hartwich, 1986 e *Cyathostomum* Molin, 1861 (LICHTENFELS, 1975; HARTWICH, 1986).

Devido ao grande número de caracteres na região cefálica, as espécies da sub-família Cyathostominae são de difícil identificação (LICHTENFELS, *op. cit.*;

OGBOURNE, 1976). A nomenclatura e a taxonomia do grupo ainda dependem de esclarecimentos (BUCKNELL *et al.*, 1996), com grande quantidade de sinônimos (OGBOURNE, *op. cit.*).

Segundo a literatura mundial, nas infecções por estrongilídeos, os ciatostomíneos representam cerca de 95% de prevalência, enquanto os estrongilíneos cerca de 5% (HERD,1990).

Dentre os nematóides citados, *S. vulgaris* é a espécie que apresenta maior patogenicidade (SOULSBY,1982), também a mais freqüente do seu gênero (LICHTENFELS, *op. cit.*; SOUTO MAIOR, 1998), embora raramente ocorra em grande número em um único animal (NICHOL & MASTERSON, 1987). Tal patogenicidade é atribuída à migração das formas larvares, que resulta em danos a tecidos de diversos orgãos. Os danos são mais evidenciados no sistema arterial mesentérico, onde ocorre a instalação das larvas de 4° estágio e adultos jovens, causando aneurismas e conseqüentemente bloqueio da circulação, resultando em cólicas, hemorragias, enfraquecimento e em alguns casos na morte do hospedeiro (MCGRAW & SLOCOMBE, 1976).

Habitualmente o diagnóstico das infecções por estrongilídeos é feito através do exame de fezes dos eqüinos. Para tanto, são empregadas técnicas de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON & WHITLOCK, 1939; RODRIGUES *et al.* ,1995) e cultivo de larvas (ROBERT'S & O'SULLIVAN,1950), não sendo possível a diferenciação das espécies de estrongilídeos pela análise morfométrica dos ovos. Esta diferenciação é alcançada através da observação

das larvas de 3° estágio encontradas nas culturas de fezes de 7 a 14 dias após a coleta que são diagnosticadas por aspectos biométricos, pelo número e arranjo das células intestinais (BEVILAQUA *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de metodologias sensíveis para o diagnóstico das infecções verminóticas é um importante recurso para a adequação do manejo e controle destas. Também, para a rápida detecção de formas imaturas (ovos e/ou larvas) dos parasitos na pastagem ou nas fezes dos hospedeiros, possibilita a agilização das medidas preventivas.

Devido a dificuldade de se estabelecer testes bioquímicos e imunológicos confiáveis para o diagnóstico gênero-específico ou espécie-específico das estrongilíases (NICHOL & MASTERSON, 1987; SOULE, 1990), novas metodologias envolvendo o estudo do DNA ribossomal, abundante nos organismos, têm sido propostas (CAMPBELL *et al.*, 1995).

Além disto, os ácidos nucléicos (rRNA e rDNA) destes parasitos possivelmente forneçam padrões estáveis para caracterizar as espécies, por apresentarem pouca ou nenhuma variação intra-específica. Este atributo é observado principalmente no segundo espaço interno transcrito (ITS_2) do rDNA, como observado nos tricostrongilídeos (GASSER *et al.*, 1994; HOSTE *et al.*, 1995).

O presente estudo busca avaliar a viabilidade da diferenciação através da comparação entre os produtos da amplificação do DNA genômico das espécies de *Strongylus* aos de outros organismos filogeneticamente próximos, eliminando

possíveis dúvidas no diagnóstico molecular das espécies em questão. Através da aplicação de "primers" aleatórios na reação em cadeia da polimerase (RAPD), investigar a possibilidade do uso dos padrões eletroforéticos das amp

lificações aleatórias do DNA genômico das espécies como marcadores da diferenciação inter-específica. E assim, colaborar com estudos posteriores visando o aprofundamento das questões taxonômicas e filogenéticas, e principalmente o desenvolvimento de metodologia rápida, segura e acessível que possibilite o diagnóstico dos ovos e larvas de estrongilídeos nas fezes e/ou nas pastagens.

REVISÃO DE LITERATURA

Limitações do diagnóstico parasitológico e perspectivas de diagnóstico através dos ácidos nucléicos:

O diagnóstico parasitológico através do exame das fezes, seja por método direto ou por concentração, em inúmeros casos requer do examinador grande experiência na identificação dos helmintos pela morfologia dos ovos (DEPLAZES *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 1996). Ainda assim, a diferenciação de inúmeras espécies de nematóides, cestódeos e trematódeos, através da morfologia dos ovos, torna-se bastante difícil ou até mesmo impossível. Além disto, o diagnóstico coproparasitológico acurado é de forma usual dependente da presença de infecção patente. Porém, mesmo durante este período, a eliminação de ovos ou proglótides pode ser irregular, tornando difícil o diagnóstico (FRASER & CRAIG, 1997).

Outrossim, em infecções assintomáticas como geralmente ocorre nas cestodíases, o diagnóstico precoce é de grande importância por serem seus estágios larvários nos tecidos de grande significado em saúde pública. Por exemplo, a infecção humana por *Taenia solium*, através da contaminação por ovos via fecal–oral resulta em neurocisticercose, cujo principal sintoma é a epilepsia (REY, 1991).

As metodologias baseadas nos ácidos nucléicos são apresentadas como alternativas para solucionar as dificuldades citadas anteriormente, pois independem da imunocompetência ou história clínica prévia e podem distinguir organismos similares e/ou que possam compartilhar epitopos antigênicos. Estes organismos não precisam ser viáveis ou cultiváveis.

Estudos envolvendo o uso da Reação de Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reation – PCR) a partir de amostras de diversos tecidos e secreções de organismos hospedeiros, têm demonstrado potencialidades diferenciais e, consequentemente, viabilidade diagnóstica de várias infecções parasitárias de interesse médico e veterinário, principalmente por protozoários (BURG *et al.*, 1989; PARMLEY *et al.*, 1992; GUAY *et al.*,1993).

As infecções por helmintos gastrointestinais também podem ser detectadas pelo uso de técnicas moleculares, particularmente através da identificação do DNA a partir de ovos encontrados nas fezes. O desenvolvimento de técnicas utilizando a PCR, tende a proporcionar ensaios totalmente espécie – específicos, além do alto grau de sensibilidade demonstrado através da detecção de

baixíssimas concentrações do material nas fezes, o que ratifica a sua superioridade sobre as técnicas imunológicas (FLISSER *et al.*, 1988; BRETAGNE *et al.*, 1993; WU *et al.* 1997), embora alguns estudos mencionem dificuldades na recuperação e amplificação dos ácidos nucléicos de parasitos devido à substâncias impedientes encontradas nas fezes (CHAPMAN *et al.*1995; MATHIS *et al.*, 1996).

Além dos fatores inibitórios encontrados nos diversos materiais biológicos analisados, existem aqueles próprios dos organismos pesquisados. CARY (1996) salienta que o sucesso nos experimentos moleculares depende diretamente da qualidade e quantidade de DNA extraído. Cita como exemplo que, a riqueza em lipídios encontrada em ovos recém eliminados e em embriões de organismos marinhos, ocasiona grande redução na recuperação do material nucléico, além do efeito inibidor causado por seus resíduos sobre ação da polimerase utilizada nos experimentos de amplificação e das endonucleases utilizadas em digestões. GASSER *et al.* (1993) citam que a maioria das extrações de DNA necessita ser seguida de purificação, pois além do efeito inibitório, algumas substâncias como os polissacarídeos, podem causar amplificação de produtos não específicos.

A utilização de colunas de trocas iônicas tem apresentado efeitos satisfatórios na extração e/ou tratamento das amostras em diversos ensaios (GASSER, *op. cit.*; CARY, *op. cit.*; WU *et al.*,*op. cit*; JACOBS *et al.*, 1997; NEWTON *et al.*; 1998).

Estudos moleculares diferenciais e aplicabilidade das metodologias no diagnóstico dos parasitos:

Várias publicações revelam resultados promissores em estudos moleculares evolutivos e taxonômicos de diversos gêneros e espécies de parasitos. O acúmulo de informações acerca dos diferentes segmentos dos ácidos nucléicos desses organismos, certamente permitirá novas metodologias diagnósticas utilizando marcadores moleculares que os diferenciem.

Buscamos fundamentar nossos estudos em uma revisão sobre a utilização dos ácidos nucléicos (rDNA e rRNA), principalmente daqueles segmentos referentes aos espaços internos transcritos (ITS_1 e ITS_2) do rDNA de protozoários em geral e de helmintos gastrointestinais.

Correlações filogenéticas estreitas entre *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* são observadas através da comparação das seqüências amplificadas do rDNA destes organismos (HOLMDAHL *et al.*, 1994; ELLIS *et al.*, 1994). HOLMDAHL & MATTSON (1996) evidenciaram a presença de produto de amplificação com 279 pb do 1° espaço transcrito (ITS_1) do rDNA de *N. caninum*, mantida em camundongos, que o diferencia de *T. gondii*, cultivado em células Vero, de *Sarcocystis cruzi*, de *S. fusiformis*, de *S. gigantea* e de *S. tenella*, isoladas de animais naturalmente infectados.

Em estudos moleculares comparativos entre *N. caninum*, cultivada em células renais de coelhos, e cepas de *T. gondii* mantidas em camundongos,

HOMAN *et al.* (1997) corroboraram que a região ITS_1 constitui um bom marcador para a distinção destes dois gêneros correlatos, mas não para diferenciar cepas de *T. gondii* por eles estudadas que guardam estreita semelhança em suas seqüências. Outros autores confirmaram a aplicabilidade diagnóstica da técnica de PCR em estudos epidemiológicos das neosporoses (PAYNE & ELLIS, 1996; HO *et al.*, 1997).

ELLIS (1998) revisou estudos relacionados ao diagnóstico da toxoplasmose e da neosporose, baseados na detecção do DNA destes organismos. Salientou que a partir das informações acumuladas acerca de seqüências de DNAs de *T. gondii*, protocolos para o diagnóstico de *N. caninum* têm sido propostos. Ainda que, a padronização e o desenvolvimento de um Kit comercial de PCR para o diagnóstico poderia resolver as inadequações encontradas em PCRs realizadas em diversos laboratórios de diagnósticos.

Estudo realizado por DAWSON *et al.*(1996) buscou reconhecer o reservatório silvestre da Ehrlichiose humana, causada pela *Ehrlichia chaffeensis*, investigando veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*). Dez amostras sangüíneas de animais soropositivos foram analisadas através da PCR, seguida de mapeamento com enzimas de restrição e seqüenciamento do segmento 16 S do rDNA . A comparação das seqüências obtidas às demais já demonstradas, apontaram para um organismo correlato à *Ehrlichia*, ainda não descrito, o que endossa a importância das metodologias moleculares nos estudos epidemiológicos.

WATT *et al.* (1997) correlacionaram a intensidade das bandas obtidas em produtos de PCR do rDNA em gel de agarose, ao número de esporoblastos de *Theileria parva* contidos em glândulas salivares do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*, associando os dados à parasitemia nos bovinos envolvidos no estudo. Em adição desenvolveramm metodologia com "primers" específicos capazes de distinguir *Theileria parva*, protozoário patogênico, de *T. taurotragi*, espécie não patogênica também transmitida aos bovinos por *R. appendiculatus*.

KATAKURA *et al.* (1997) ressaltaram as limitações das técnicas convencionais de detecção e identificação de hemoprotozoários, demonstraram a especificidade e sensibilidade da técnica de PCR e propuseram o seu uso com vistas a facilitar os estudos da epidemiologia das tripanosomíases africanas em bovinos na Zambia.

HOWE *et al.* (1997) a partir da análise de perfis eletroforéticos de produtos amplificados do rDNA de *Acanthamoeba spp.*, isoladas de humanos, demonstraram a correlação entre os padrões de bandas apresentados e a capacidade patogênica das espécies estudadas.

Relatos iniciais demonstraram a possibilidade de diferenciação entre ovos de *Taenia solium* e *Taeniarhynchus saginatus*, morfologicamente idênticos, através do emprego da hibridização do DNA (RISHI & MCMANUS, 1987; FLISSER *et al.*, 1988). A padronização da PCR, em estudos recentes, aperfeiçoou o diagnóstico destas espécies (GOTTSTEIN *et al.*, 1991).

Através do emprego de "primers" específicos BRETAGNE *et al.* (1993) padronizaram o diagnóstico de ovos de *Echinococcus multilocularis* em fezes de raposas. Ressaltaram os autores que, além da sensibilidade, a técnica apresenta 100% de especificidade, não havendo reações cruzadas entre esta espécie e *E. granulosus*.

GASSER & CHILTON (1995) a partir da amplificação de (ITS_2) do rDNA de vários isolados geográficos (larvas ou adultos) de sete espécies de cestódeos teniídeos (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis, Taenia hidatigena*, *T. ovis*, *T. psiformis*, *T. multiceps* e *T. serialis*) , e digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição (RFLP - PCR) estabeleceram padrões de diferenciação entre as espécies de *Taenia*. Porém, devido ao número limitado de isolados examinados, não afirmaram com segurança a inexistência de variações intra–específicas. Ressaltaram a capacidade de diferenciação entre as espécies de *Echinococcus*, e entre estas e as demais utilizando a metodologia proposta. Citaram ainda, a possibilidade de através dos padrões dos produtos de restrição de *Echinococcus granulosus*, determinar a existência de variedades desta espécie.

BLAIR *et al.* (1997) analisou 11 isolados asiáticos de *Paragonimus westermani*, através de produtos de PCR com 363 pb referentes a amplificação da seqüência ITS_2 e de 393 pb relativos ao segmento do DNA mitocondrial (Citocromo oxidase – COI). Através das diferenças observadas nas seqüências

foram estabelecidos 2 grupos distintos, de acordo com a distribuição geográfica e família de moluscos utilizados como hospedeiros intermediários.

Diferentes nematóides parasitos têm sido identificados através da tecnologia dos ácidos nucléicos (DAME *et al.* , 1991). Para tal finalidade a utilização do rRNA e rDNA demonstrou ser de maior aplicabilidade pela sua abundância nos organismos e por sua pouca ou nenhuma variação intraespecífica. Isto ocorre principalmente com o segundo espaço interno transcrito (ITS-2) do rDNA, conforme evidenciado em tricostrongilídeos (GASSER *et al.*, 1994; HOSTE *et al.* , 1995).

GASSER *et al.* (1993) aplicam a PCR seguida de seqüenciamento de produtos de ITS_2 do rDNA em isolados de um único nematóide ou um único ovo de *Trichostrongylus spp.*, demonstrando assim a simplicidade, a rapidez e a sensibilidade da metodologia, demonstrando ainda sua aplicabilidade em estudos filogenéticos e sistemáticos dos parasitos.

GRANT & WHITINGTON (1994) comparam as cepas australianas McM e KRT de *Trichostrongylus colubriformis*, respectivamente Benzimidazol – sensível e Benzimidazol – resistente, através do corte do DNA com endonucleases de restrição e de hibridização. Salientaram, mediante o polimorfismo observado, a aplicabilidade dos marcadores genéticos em estudos epidemiológicos experimentais e de campo, na construção de mapas genéticos para a definição de aspectos biológicos diversos (resistência à drogas antihelmínticas, variabilidade

de hospedeiros, potencial hipobiótico, entre outros), e como medidores de fluxo gênico entre parasitos.

STEVENSON *et al.* (1995), comparam 10 isolados de *Haemonchus contortus* oriundos de ovelhas, a 3 amostras de *H. placei*, específico de bovinos, todos de procedências diversas, através de amplificação por PCR da região ITS_2 do rDNA seguida de seqüenciamento, reconhecimento dos sítios de restrição e corte dos produtos com as enzimas *Fok* I e *Bfa* I. A comparação entre as seqüências demonstrou diferenças na posição de 3 nucleotídeos, e a PCR – RFLP revelou padrões distintos entre as espécies.

ZARLENGA *et al.* ($1994_{a\,b}$) analisaram as poucas variações em seqüências rRNA de *H. contortus, H. placei* e *H. similis*, as das espécies da subfamília Nematodirinae, e aquelas observadas por DAME *et al.* (*op. cit.*) em Ostertagiinae. Concluiram ter sido insuficiente o tempo decorrido na história evolutiva de Trichostrongyloidea para que divergências tenham ocorrido de forma substancial. Para diferenciar as espécies e gêneros desta Superfamília, sugerem a observação de moléculas de ácidos nucléicos que evoluem mais rapidamente como acontece com o DNA mitocondrial, por exemplo.

CAMPBELL *et al.* (1995) estudando 3 das 4 espécies do gênero *Strongylus* (*S. edentatus, S. equinus* e *S. vulgaris*) coletados em necropsias de cavalos nos E.U.A. e Austrália, amplificaram a região ITS_2 do rDNA de isolados das mesmas. Em seguida os produtos de PCR , consecutivamente com 235, 229 e 217 pb foram seqüenciados e submetidos à digestão por endonucleases de restrição.

Dentre as enzimas experimentadas, o uso combinado de *AluI e Vsp I* ofereceram padrões de cortes diferenciais entre as espécies. Tanto as poucas variações intra–específicas (< 1%) quanto as acentuadas variações inter–específicas (13 – 29 %) observadas nas seqüências ITS_2, demonstraram a viabilidade do uso destes segmentos no delineamento das espécies do gênero e seu uso em diagnóstico.

HUNG *et al.* (1996) em adição aos dados de CAMPBELL *et al.* (*op. cit.*) estudaram o segmento que compreende a região ITS_1, 5,8 S e ITS_2 do rDNA de *Strongylus asini*, coletado de zebra. Incluiram no mapa de restrição das espécies a endonuclease *Hae* III. A partir do sequenciamento do produto de PCR de ITS_2, com 232 pb, observaram maior similaridade genética de *S. asini* em relação a *S. equinus* (95,3 %) que a *S. edentatus* (87,1 %) e que a *S. vulgaris* (73,9%).

Os ciatostomíneos *Cylicocíclus ashworthi, C. nassatus* e *C. insignis*, têm suas seqüências de rDNA, compreendendo a região ITS_1, 5,8 S e ITS_2, comparadas por HUNG *et al.* (1997). As amostras consistiram de extratos isolados de um único helminto, procedentes da Austrália ou Reino Unido. Foram analisados 3 isolados de *C. ashworthi*, 3 de *C. nassatus* e 1 de *C. insignis*. A digestão dos produtos amplificados pelas endonucleases *Alu* I e *Rsa* I exibiu padrões de diferenciação das três espécies, e a análise das seqüências ITS_2 demonstrou que trata-se de 3 espécies distintas. Sendo que *C. ashworthi* e *C. nassatus*, muito semelhantes morfologicamente, guardam pouca diferença

genética no segmento estudado (3,8%). *C. insignis* apresenta diferenças de 5,6% e 6,2%, consecutivamente, em relação as duas espécies anteriores.

CHILTON *et al.* (1997) investigaram o uso das seqüências ITS_2 para elucidar as relações filogenéticas de 13 gêneros de Strongyloidea das famílias Strongylidae (parasitas de cavalos), Chabertiidae (parasitas de ovinos) e Cloacinidae (de macropodídeos e vombatídeos) recuperados na Austrália. Diferenças entre as seqüências das espécies estudadas, variando de 8,9 a 58%, foram observadas.

JACOBS *et al.* (*op. cit.*) observaram diferenças entre perfis eletroforéticos de produtos de PCR de ITS_2 de *Toxocara canis*, *T. cati* e *Toxascaris leonina*, digeridos pelas endonucleases *Hinf* I e *Rsa* I . Sugeriram o desenvolvimento do método para a detecção e/ou diferenciação de larvas de Ascaridoides em tecidos humanos.

NEWTON *et al.* (*op. cit.*) caracterizaram 44 espécies de nematóides da Ordem Strongylida, parasitos de porcos e ruminantes, através da RFLP dos produtos de PCR que compreendem as regiões ITS_1, 5,8 S e ITS_2, do rDNA. O material nucléico amplificado, com 870 pb em todas as espécies, exceto em *Ostertagia ostertagi* com cerca de 1250 pb, quando cortado com endonucleases de restrição (*Rsa* I, *Hinf* I, *Dra* I e *Nla* III) e submetido à eletroforese em gel de agarose revela padrões específicos característicos, exceto em *Cooperia surnabada* e *C. oncophora* com estreita identidade. Segundo os autores, os marcadores específicos apresentados podem ser utilizados em ensaios de PCR

para identificação de estágios evolutivos morfologicamente indistintos destes organismos.

Através de RFLP – PCR e comparação das seqüências dos produtos de ITS_2, ROMSTAD *et al.* (1998) demonstraram diferenças entre 3 isolados humanos de *Necator americanus* do Togo, África e 1 de Sarawak, Malásia. Ressaltaram a importância das diferenças genéticas encontradas entre as amostras africanas e a da Malásia, sugerindo estudo mais detalhado com a finalidade de determinar as diferenças morfológicas existentes entre os isolados geográficos.

A análise do polimorfismo do DNA baseado em amplificação de segmentos de DNA pela PCR usando um único "primer" de seqüências de oligonucleotídeos (Ramdomly amplified polimorphic DNA / RAPD) foi inicialmente utilizada por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & MCCLELLAND (1990). Os fragmentos assim amplificados representam regiões anônimas distribuídas aleatóriamente através do DNA genômico do organismo e proporciona padrões de identificação das espécies investigadas (STEINDEL *et al.*, 1994). Fragmentos polimórficos ou não polimórficos obtidos em RAPD podem ser utilizados como marcadores diagnósticos espécie – específicos. Um fragmento espécie - específico pode ser identificado quando presente em todos os indivíduos de uma mesma espécie (HADRYS *et al.*, 1992). Esta metodologia vem sendo amplamente utilizada para análises filogenéticas de organismos, principalmente de isolados dentro de uma espécie (HEDRICK, 1992) e tem sido utilizada com sucesso na identificação de vários grupos de parasitos (PILLAY & PILLAY, 1994; NADLER *et al.*, 1995; LUN &

DESSER, 1996; KRÁL'OVÁ, 1996; SILES *et al.*, 1997; WU *et al.*, *op. cit.*; CERE *et al.*, 1997; GUO *et al.*, 1997; JOACHIM *et al.*, 1997).

A técnica de RAPD caracteriza-se por ser simples, segura, por não incluir o uso de radioatividade, ser sensível, requerer quantidades mínimas de materiais, e sobretudo por não necessitar de informações prévias das seqüência para o estabelecimento de "primers".

PILLAY & PILLAY (*op. cit.*), evidenciaram através da análise do polimorfismo dos produtos de RAPD, variações intra – específicas em três isolados geográficos de *Schistosoma mansoni*, um deles procedente de Porto Rico e dois do continente africano (África do Sul e Namíbia). Todas as amostras procedentes do roedor silvestre *Mastomys coucha*. A amostra Porto-riquenha teve como hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata* e os isolados africanos *B. pfeifferi*, ou *B. pfeifferi* e *B. salinarum*. Baseados nos padrões eletromórficos divergentes entre as amostras centro-americana e as africanas, as últimas mais homólogas, discutiram que as variações possam ter ocorrido devido ao afastamento geográfico entre as populações. Questionaram a possibilidade de serem tais alterações hospedeiro - induzidas, pois as mesmas se mantêm por passagens sucessivas em camundongos no laboratório.

NADLER *et al.* (*op. cit.*) propuseram um modelo de estudo de infra - populações de *Ascaris suum*, no centro – oeste dos Estados Unidos da América, baseado nas observações obtidas por RAPD e nas características isoenzimáticas das amostras.

LUN & DESSER (*op. cit*), através de RAPD, observaram em isolados de *Trypanosoma spp.*, parasitos de anuros, provenientes do Canadá e EUA e ressaltaram a importância e praticidade do uso do método para a complementação dos dados morfológicos e bioquímicos destes organismos.

KRÁL'OVÁ (*op. cit.*) observaram fragmentos espécie – específicos em RAPD de duas espécies de cestódeos parasitas de peixes, *Proteocephalus exiguus e P. percae*. Isolados de diferentes hospedeiros, procedentes de diversos países europeus, demonstraram sutis variações intra–específicas. Dois dos 8 "primers" utilizados, revelaram variedades entre isolados de *P. percae*, enquanto em produtos de todos os 8 "primers" foram observadas diferenças

Padrões de amplificações distintos foram observados por SILES *et al.* (*op.cit.*) em RAPDs de larvas de *Anisakis simplex* coletadas de diferentes espécies hospedeiras (*Merluccius merluccius*, *Physcis blennoides*, *Conger conger* e *lepidorhombus boscii*) capturados no Atlântico Norte, na costa espanhola. Através dos perfis obtidos observaram duas populações distintas de parasitos.

CERE *et al.* (*op. cit.*) compararam, através de RAPD, cepas de *Eimeria intestinalis* e *E. magna*, parasitas de coelhos, com objetivo de caracterizar as linhagens pouco patogênicas ou não patogênicas, capazes de causar resposta imune, e que por isto podem ser utilizadas como vacinas vivas.

Fragmentos específicos, marcadores de virulência, foram detectados por GUO *et al.* (*op. cit.*) em RAPDs de isolados de *T. gondii* procedentes de hospedeiros humanos e não – humanos de diversos países da Europa e dos

EUA, definindo marcadores diferenciais para 17 cepas, virulentas para camundongos, das 35 estudadas.

JOACHIM *et al.* (*op. cit.*) examinam pela RAPD cepas de *Oesophagostomum dentatum* e *O. quadrispinulatum*, parasitas de porcos, oriundas do campo e de cultivos em laboratório, e de *O. radiatum* e *O. venulosum* parasitas de ruminantes, mantidos em laboratório. Experimentaram 33 "primers", dos quais 9 amplificaram marcadores polimórficos do DNA capazes de caracterizar espécies, cepas e grupos de cepas destes organismos.

WU *et al.* (*op. cit.*) após amplificação aleatória do DNA genômico de *T. canis*, isolaram, clonaram e sequenciaram banda com 293 pb, definindo "primers" específicos, comuns para *T. canis* e *T. cati.*

MATERIAL E MÉTODOS

1- Locais de realização dos experimentos

Os experimentos deste estudo foram realizados parcialmente no Laboratório de Helmintologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em Seropédica, Rio de Janeiro e no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro - RJ. As necropsias foram realizadas na EPPWON – UFRRJ e no Laboratório de Inspeção do Ministério da Agricultura instalado no Frigorífico King Meat S/A, em Londrina – PR.

2- Obtenção de parasitos adultos

Foram obtidos espécimes adultos pertencentes aos gêneros *Strongylus*, *Triodontophorus*, *Cyathostomum*, *Cyliclocyclus*, *Cylicostephanus*, *Coronocyclus* e *Gyalocephalus* em necropsias de eqüinos fêmeas sem raça definida (SRD), realizadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Outros, exclusivamente do gênero *Strongylus*, foram coletados de eqüinos (SRD) de ambos os sexos abatidos no Frigorífico King Meat S/A.

3- Identificação dos parasitos adultos

Após a remoção dos vermes do intestino grosso dos hospedeiros, processou-se a lavagem dos mesmos em solução fisiológica e a identificação através da morfologia, sem diafanização, de acordo com LICHTENFELS (*op. cit.*), e a preservação por congelamento (- 20° C) até serem submetidos à extração do DNA.

4- Contagem de ovos e cultivo de larvas de terceiro estágio (L_3) de estrongilídeos em fezes de eqüinos

Foram realizadas contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e larvacultura de 13 amostras fecais (anexo I) coletadas diretamente da ampola

retal de eqüinos adultos de ambos os sexos, sem raça definida, provenientes do campus da UFRRJ, utilizando, consecutivamente, as técnicas para contagem de ovos de GORDON & WITHLOCK (*op. cit.*), modificada por UENO & GONÇALVES (1994) e para coprocultura de ROBERTS & O'SULLIVAN (*op. cit.*).

5- Identificação das larvas (L_3) obtidas em cultivos

As larvas recuperadas das culturas foram identificadas segundo BEVILAQUA *et al.* (*op. cit.*). O número total de larvas foi estimado à partir de contagem em alíquota de 100 µl. Após a contagem, o excedente foi concentrado por sedimentação, transferido para microtubos e congelado (- 20^0 C) para posterior extração de DNA genômico.

6- Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico obedeceu basicamente o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989), com ligeiras modificações (anexo II).

Os espécimes de *Triodontophorus sp.*, *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus*, e dos ciatostomíneos: *Cyathostomum sp.*, *Cyliclocyclus sp.*, *Cylicostephanus sp.*, *Coronocyclus sp.*, *Gyalocephalus sp.*, utilizados na extração foram aqueles provenientes do Estado do Rio de Janeiro. Os de *S. equinus* foram os oriundos do Estado do Paraná.

Isolados com cerca de 23 helmintos adultos, machos e fêmeas, de cada espécie do gênero *Strongylus* e *Triodontophorus*, e cerca de 15 espécimes de cada gênero de ciatostomíneo, foram submetidos à maceração rápida até formar massa homogênea.

Frações de 100 μl do macerado, por espécie, postas em microtubo, foram ressuspensas em 400 μl de solução 100 mM de Tris / 10 mM de EDTA pH 7,5 adicionadas de 2,5 μl de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 100 μg de proteinase K Sigma® (2 μl de solução estoque 25 mg / ml), homogeneizadas em agitador mecânico e incubado em banho-maria a 56° C por 2 horas.

Após este período à suspensão foram adicionados 200 μl de fenol tamponado (pH 7,8) e 200 μl de clorofórmio e, após suave agitação por inversão do microtubo, a preparação foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos em micro - centrífuga Eppendorf®.

Do sobrenadante foram aspirados 300 μl e repetida por duas vezes a extração com fenol / clorofórmio. Finda a última centrifugação, foram transferidos 300 μl do sobrenadante para novo microtubo e a estes adicionados 33 μl de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 800 μl de etanol absoluto.

Após nova centrifugação o sedimento foi ressuspenso em 1000 μl de etanol 70%, e novamente centrifugado como acima descrito. O sobrenadante então foi decantado, e o microtubo invertido sobre papel absorvente a fim de se promover a completa secagem do sedimento, que a seguir era ressuspenso em 150 μl de Solução 10 mM de Tris / 1 mM de EDTA, pH 7,5.

Aplicou-se o procedimento citado anteriormente em macerados obtidos à partir de 6 espécimes de *Ascaridia numidae*, 150 espécimes de *Schistosoma mansoni* e em quantidades estimadas em 25.000 larvas de ciatostomíneos.

7- Purificação dos extratos de DNA genômico

Após a extração do DNA, procedeu-se a purificação das amostras, buscando eliminar compostos orgânicos de outra natureza ou resíduos de fenol, de clorofórmio ou de sais que por ventura pudessem inibir as reações de amplificação. Com este objetivo foi utilizado nesta etapa o "Kit" RapidPrep - Pharmacia Biotech® para isolamento de DNA genômico de células e tecidos, conforme metodologia proposta pelo fabricante.

As concentrações de DNA em cada amostra eram determinadas através do uso do aparelho de quantificação Gene Quant - Pharmacia Biotech®.

8- Eletroforese dos extratos de DNA genômico em mini - gel de agarose a 1%

Dos extratos purificados, 10 μl foram submetidos à eletroforese em mini - gel de agarose a 1% (anexo III e VII_a) em tampão Tris – borato – EDTA 1X (TBE) (anexo VII_c) . Cada amostra foi corada com 2 μl do tampão de carregamento 6 X (anexo VII_b). Utilizou-se como tampão de corrida TBE 1X, nas seguintes condições: voltagem de 50 volts, amperagem aproximada de 100 miliamperes

(mA) por cerca de 70 minutos[1]. Utilizamos como marcador de peso molecular o DNA genômico do bacteriófago λ digerido pela enzima *Eco* RI (21.226, 7.421, 5.804 – 5.643, 4.878 e 3.530 pb / Gibco - BRL®).

Após a corrida o gel foi imerso em solução de brometo de etídeo em TBE (0,5 μg / ml) e posto em agitação por cerca de 30 minutos.

A presença de bandas de DNA com concentração igual ou superior a 20 ng era observada por transluminação do gel por radiação ultravioleta. A documentação fotográfica era feita pelo sistema Polaroid® MP4 – "Landcamera" com filme tipo 665.

9- Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As sequências iniciadoras de polimerização do DNA ("primers") utilizadas no experimento foram definidas à partir do segmento ITS-2 de *Caenorhabditis elegans* (Genebank nº de acesso XO 3680), e denominadas ITS-2A (TGAAATTTCGAACGAAT), e ITS-2B (TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) (ELLIS *et al.*, 1986), e sintetizadas pela GIBCO - BRL®.

Para a realização das reações constituiu-se a solução inicial, ou "master-mix", aqui batizada solução 1. Para tanto, para cada reação, foram utilizados: 5 μl de tampão diluidor da enzima Taq DNA polimerase 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4

[1] As corridas eletroforéticas eram encerradas após a saída do corante Xilenocianol, de menor peso molecular (PM = 538) que o Azul de Bromofenol (PM = 691). Para isto, o tempo necessário tornava-se variável de acordo, principalmente, com a condutividade do tampão e concentração do gel.

/ 500 mM KCl / 25 mM $MgCl_2$), 1 µl de solução de $MgCl_2$ 50mM[2], 1 µl de cada desoxirribonucleotídeo (200µM) [desoxitimina (dT), desoxicitosina (dC), desoxiguanina (dG) e desoxiadenina (dA)], 5 µl (1µM) do "primer" ITS2-A e , 5 µl (1µM) do ITS2-B. Os volumes dos reativos eram multiplicados pela quantidade de reações.

A solução 1 somou o volume de 19 µl por tubo. À este volume somou -se individualmente 1 µl (1 ng) das amostras a serem testadas (exceto no tubo de controle negativo, no qual este volume fora substituído por água deionizada estéril), 28,5 µl de água deionizada estéril (29,5 µl no controle negativo) e 50 µl de óleo mineral.

Além do controle negativo, incluímos entre as amostras a serem testadas extratos de DNA de *Schistosoma mansoni*, *Ascaridia numidae* e de larvas de Cyathostominae como grupos externos. Foi incluído também, amostra de DNA de *Caenorhabditis elegans*, como controle positivo. Assim, o preparo era levado à máquina termocicladora (Perkin Elmer® Cetus 4800), estabelecendo primeiramente uma partida quente (98° C / 2 min.) e repouso a 94° C pelo tempo necessário para colocação da enzima Taq DNA polimerase (0,5 µl para cada tubo/2,5 unidades/Perkin Elmer®). Logo após iniciavam-se os ciclos termais: Desnaturação a 94° C por 1 minuto; hibridização a 55°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, num total de 30 ciclos.

---

[2] Conforme avaliação prévia das concentrações de Cloreto de Magnésio, na concentração de 3,0 mM por reação observaram-se melhores amplificações.

10- Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 1,5%

Analisamos 20% do volume dos produtos de PCR (10 μl) corados com 2 μl do tampão de carregamento 6x, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, nas seguintes condições de corrida: 87 volts, ≅140 mA, durante 90 minutos, utilizando como tampão de corrida TBE 1X, e como padrão de peso molecular o DNA do bacteriófago Φx 174 RF digerido pela enzima *Hae* III (1.353, 1.078, 872, 603, 310, 271 – 281, 234, 194, 118 e 72 pb / GIBCO - BRL®).

O gel era corado pela solução de brometo de etídeo em TBE 1X (0,5 μg / ml). A visualização das bandas era feita por transluminação do gel por radiação ultravioleta. A documentação fotográfica era feita pelo sistema Polaroid® MP4 – "Landcamera" com filme tipo 665.

11- Cálculo dos pesos moleculares dos produtos de PCR

A partir da imagem digitalizada do registro fotográfico do gel, aplicou-se o programa Gel - Pro analyzer versão 3.0 (Media Cybernetics) para cálculo de pesos moleculares de bandas situadas nas faixas intermediárias daquelas aferidas pelo padrão de peso molecular.

12-Análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente (Random Amplified polymorphic DNA - RAPD)

12.1- Escolha dos "primers" aleatórios:

Os "primers" randômicos ou aleatórios testados nos experimentos de RAPD foram escolhidos à partir de seqüências aplicadas com sucesso em outros estudos envolvendo organismos diversos. A partir das informações obtidas na literatura, foi solicitada a síntese das seqüências de alguns deles à GIBCO BRL®.

As seqüências dos "primers" OPG - 03, OPG - 16, OPG - 18 e OPG - 19, foram definidas pelo Operon Biotechnologies Inc. (EUA), e do UNB - 63, sintetizada inicialmente pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília . Todos utilizados por SOARES *et al.* (1995), em análise dos produtos de RAPD de isolados sul-americanos de *Paracoccidioides brasiliensis*. Os "primers" nomeados UBC - 322, UBC - 345 e UBC - 348, confeccionados pela University of British Columbia (EUA) foram aplicados por NADLER *et al.* (*op. cit.*) em estudo molecular diferencial, utilizando a técnica de RAPD, em populações de *Ascaris suum* no centro-oeste norte americano.

Os demais "primers" (OPK – 01, OPK – 14, OPK – 20, OPC – 02, OPC – 11, OPS – 17 e OPR – 11), sintetizados para experimentos taxonômicos de espongiários no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ (Prof. Rodolpho Albano, comunicação pessoal), foram gentilmente cedidos pelo

responsável pela pesquisa. Os "primers" empregados no estudo encontram-se especificados no quadro 1.

12.2- Protocolo de RAPD:

Na constituição da solução inicial, ou solução 1 foram utilizados por reação: 5 μl de tampão diluidor da enzima Taq DNA polimerase 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4 / 500 mM KCl / 25 mM $MgCl_2$), 2 μl (200μM) de cada desoxirribonucleotídeo [desoxitimina(dT), desoxicitosina (dC), desoxiguanina (dG) e desoxiadenina (dA)] e 2 μl de solução de cloreto de magnésio (Mg Cl_2) a 50 mM[3].

Ao volume de 15 μl da solução 1 somaram-se individualmente 1 μl de cada "primer" (concentração entre 200 e 300 nM), 2 μl (0,5 ng) da amostra de DNA a ser testada (exceto no tubo de controle negativo, no qual este volume foi substituído por água deionizada estéril), 26,0 μl de água deionizada estéril (28,0 μl no controle negativo), 5,0 μl de glicerol e 50 μl de óleo mineral.

Extratos de DNA de *Strongylus edentatus*, de *S. equinus*, de *S. vulgaris*, de *Triodontophorus sp.*, de *Caenorhabditis elegans*, do "pool" de larvas de ciatostomíneos, e de espécies adultos de ciatostomíneos: *Cyathostomum sp.*, *Cyliclocyclus sp.*, *Cylicostephanus sp.*, *Coronocyclus sp.*, *Gyalocephalus sp.*,

[3] Conforme avaliação prévia das concentrações de Cloreto de Magnésio, na concentração de 3,5 mM por reação observaram-se melhores amplificações.

constituíram as amostras a serem submetidas à reação, além do controle negativo.

Assim, o preparo era levado à termocicladora (Perkin Elmer® Cetus 4800), estabelecendo primeiramente uma partida a 98°C por 2 minutos e um período de repouso a 94°C por tempo necessário para colocação da enzima Taq DNA polimerase (1,0 μl para cada tubo / 2,5 unidades / Perkin Elmer®). Logo após iniciavam-se os ciclos termais: Desnaturação a 94°C por 2 minuto; hibridização a 35°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minuto, num total de 30 ciclos. Após este processo, foi adicionado um período de extensão de 7 minutos a 72°C, findo o qual a temperatura foi reduzida para 4°C por tempo indeterminado.

13- Eletroforese dos produtos de RAPD em gel de poliacrilamida a 6%

Foram analisados 20% do volume (10 μl) dos produtos de RAPD corados com 2 μl do tampão de carregamento 6x, através da eletroforese em gel contínuo de poliacrilamida a 6% (anexo IV), empregando as seguintes condições de corrida: 100 volts, ≅40 mA iniciais e ≅20 mA finais, durante cerca de 70 minutos em tampão Tris - Borato - EDTA (TBE) 1X, e como padrão de peso molecular DNA do plasmídio SK+ digerido pela enzima *Hinf* I (920, 517, 456, 396, 356 pb) elaborado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do IBRAG / UERJ).

Após a corrida procedeu-se a coloração pela solução de prata amoniacal (Anexo V e VII_e) para visualização das bandas decorrentes da migração dos produtos amplificados, e posterior secagem dos géis (Anexos VI e VII_f) para serem arquivados para posterior análise.

14-Análise computacional de correlação genética das amostras

Para o cálculo de correlação genética das amostras, utilizou-se o pacote de RAPDistance - versão 1.04, onde a partir do critério ausência (0) ou presença (1) de banda numa determinada posição numerada de acordo com o aparecimento no gel, foram comparadas as amostras duas a duas. Através destes dados obteve–se um padrão algoritmico que pode ser assim representado: $\mathbf{2 \times n_{11} / ((2 \times n_{11}) + n_1 + n_{10})}$, onde, n_{11} = nº de posições onde ambas as amostras possuem banda (a = 1, b = 1); n_1= nº de posições onde só a 2ª amostra possui a banda (a = 0, b = 1) e n_{10}= nº de posições onde só a 1ª amostra possui banda (a = 1, b = 0) (NEI & LI, 1979). Mediante o cálculo das similaridades entre as amostras, construiu -se uma matriz e através do Programa UPGMA (Unweighted pair group arithmetic averages) obteve–se uma árvore representativa das distâncias entre as espécies (fenograma) frente às diferenças de bandas obtidas pela amplificação aleatória de seus DNAs genômicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das necropsias realizadas no campus da UFRRJ foram recuperados 102 espécimes adultos de *S. vulgaris* (70 fêmeas e 32 machos), 23 da espécie *S. edentatus* (15 fêmeas e 8 machos), 30 de *Triodontophorus sp.* (20 fêmeas e 10 machos), 24 de *Cyathostomum sp.* (15 fêmeas e 9 machos), 25 de *Cyliclocyclus sp.* (19 fêmeas e 6 machos), 20 *Cylicostephanus sp.* (13 fêmeas e 7 machos), 28 de *Coronocyclus sp.* (18 fêmeas e 10 machos), 23 *Gyalocephalus sp.* (16 fêmeas e 7 machos).

Daqueles helmintos procedentes das necropsias efetuadas em Londrina, 31 foram determinados como *Strongylus equinus* (16 fêmeas e 15 machos), 288 como *S. edentatus* (165 fêmeas e 122 machos), e 56 como *S. vulgaris* (48 fêmeas e 8 machos).

Como resultado dos exames das 13 amostras de fezes dos eqüinos confinados em piquetes na UFRRJ, foram obtidas nas contagens de ovos,

23188
F.R.R.J. - BIBLIOTECA CENTRAL
REGISTRO 037/99

números que variaram de 1.650 a 7.050 ovos, e recuperados da solução de açúcar de 7 a 176 ovos em cada 50µl.

Do material exposto à sedimentação espontânea foram encontrados cerca de 900 ovos em cada 50µl. Alíquotas de 200 a 600 µl, correspondendo a cerca de 3.600 a 10.800 ovos foram estocadas sob refrigeração, para estudos moleculares posteriores.

As larvas cultivadas foram assim identificadas: Em dez amostras foram encontradas somente larvas de Cyathostominae, em 2 amostras, larvas de Cyathostominae e *S. vulgaris*, e em uma larvas de Cyathostominae, de *S. vulgaris* e de *S. equinus*. As quantidades obtidas dos sedimentos variaram de 2.500 a 137.500 larvas.

Como resultado da extração de DNA genômico revelaram-se em gel de eletroforese, bandas com cerca de 21.000 pb, compatíveis com moléculas de DNA de alto peso molecular (Figura 1).

Através da reação em cadeia da polimerase, foram obtidas bandas em gel de agarose dos produtos amplificados de DNA com tamanhos de 372, 372 e 357 pb, respectivamente para as amostras oriundas de *Strongylus edentatus*, *S. equinus* e *S. vulgaris*, conforme aquelas já demonstradas em estrongilídeos da Austrália. Destes, aos produtos de ITS_2 seqüenciados com 235, 229 e 217 pb somaram-se 132 bases das seqüências flanqueadoras 5' e 3', que ao gel de agarose haviam sido observadas como bandas de 367, 361 e 349 pb, respectivamente(CAMPBELL *et al.*, *op. cit.*).

Nossos dados ampliaram as informações ao demonstrarem mediante o uso de "primers" idênticos aos utilizados por CAMPBELL *et al.* (*op. cit.*) a presença de produtos amplificados com peso molecular de 428 pb em larvas de Cyathostominae e de *Triodontophorus sp.* (não ilustrado para este),e a ausência de amplificação em *S. mansoni* e *A. numidae*, incluídos como controles negativos por se tratarem de grupos externos. Obtivemos amplificação de seqüência, com peso molecular superior, 524 pb, a partir de DNA genômico de *C. elegans*, controle positivo, o que demonstra a confiabilidade dos resultados (Figura 2).

Em contrapartida nossos estudos demonstram que apesar da falta de especificidade (específica) dos "primers" empregados por CAMPBELL *et al.* (*Op. cit.*), e no presente trabalho, é possível através de seu uso discriminar os gêneros estudados. E quando acrescidos de outros ensaios moleculares, o diagnóstico genérico é alcançado. Isto demonstra a necessidade de ampliação de pesquisas envolvendo a aplicação desta metodologia em um número maior de espécies parasitas de eqüinos.

Não foram observadas amplificações nas amostras dos 5 gêneros (*Cyathostomum*, *Cyliclocyclus*, *Cylicostephanus*, *Coronocyclus* e *Gyalocephalus*), apesar das diversas modificações metodológicas experimentadas. Possivelmente por não serem os ciatostomíneos pesquisados das mesmas espécies das larvas utilizadas no estudo. Outra hipótese a ser considerada é a de que as quantidades de DNA genômico extraídas (não determinadas para estes extratos) não terem

sido suficientes para o uso em reação. Tais indagações apontam para a necessidade de ampliação das investigações acerca destas questões.

A controversa sistemática dos ciatostomíneos, conforme demonstrado por BUCKNELL *et al.* (*Op. cit.*), e por SOUTO MAIOR (*Op. cit.*), e a notória escassez de informações sobre estudos moleculares nesta sub-família, nos faz ratificar a necessidade da ampliação dos variados estudos acerca destes organismos. As técnicas moleculares poderão ajudar de forma substancial para isto, haja visto a resolução da questão de estreita identidade entre *Cylicocyclus ashworthi* e *C. nassatus* por HUNG *et al.* (1997).

É necessário ressaltar que em nossos experimentos o par de "primer" utilizado em PCR dos espécimes adultos de ciatostomíneos diferiu daqueles utilizados por HUNG *et al.* (1997), o que nos remete à necessidade de ampliação do número de seqüências iniciadoras e de organismos experimentados

Conforme observado em diversos estudos (HOLMDAHL & MATTSON, *op. cit.*, HOMAN *et al.*, *op. cit.*, GASSER & CHILTON, *op. cit.*, HUNG *et al.*, *op. cit.*, BLAIR *et al.*, *op. cit.*, NEWTON *et al.*, *op. cit.*, e ZARLENGA *et al.*, $1994_{a\ b}$), somente a análise dos pesos moleculares dos produtos amplificados a partir do rDNA das espécies não oferece padrão discriminatório para identificação das espécies. Para tal finalidade, outras metodologias somam-se a esta. Dentre estas destacam a análise da extensão do polimorfismo dos fragmentos de DNA, obtidos pela digestão dos produtos de PCR, com enzimas de restrição (RFLP-PCR) e a análise do polimorfismo dos produtos de amplificações aleatórias (RAPD).

Os estudos por RFLP comparados àqueles em que é utilizada a RAPD são mais laboriosos e acima de tudo oferecem padrões de bandas inferiores. Além disto, conforme descrito por HADRYS *et al.* (*op. cit.*), os padrões de bandas oferecidos por RAPD permitem utilização de fragmentos, polimórficos ou não, como marcadores diagnósticos espécie–específicos. A técnica de RAPD caracteriza-se também por ser simples, segura, não incluir necessariamente o uso de radioatividade, ser sensível, requerer quantidades mínimas de materiais, e sobretudo por não necessitar de informações prévias das seqüência para o estabelecimento de "primers".

As mínimas variações em termos de peso molecular dos produtos amplificados a partir das seqüências ITS-2 de rDNA das três espécies de *Strongylus*, bem como a observação da amplificação em outros gêneros, inviabilizaram as perspectivas da aplicabilidade desta metodologia para a análise espécie-específica de helmintos adultos, ovos ou larvas sem que houvesse adição de outro procedimento, o que nos levou a optarmos por experimentar a RAPD como alternativa complementar.

Dentre os 15 "primers" utilizados nas reações de RAPD os de número 3, 4 e 5 (OPG-18, OPG- 19 e UNB-63) possibilitaram multiplicidade de bandas (Quadro 2) em produtos de todas as espécies de estrongilíneos (*Strongylus edentatus, S. equinus, S. vulgaris*, e *Triodontophorus sp.*), de *C. elegans* e das larvas de ciatostomíneos estudadas. Em todas as 6 amostras submetidas ao RAPD com os 3 "primers", os padrões de bandas obtidos foram discriminatórios.

Porém observa-se claramente, a proximidade de identidade mantida entre o padrão de bandas do produto de amplificação das larvas de ciatostomíneos e de *C. elegans*. Assim como nos ensaios de PCR, não obtivemos amplificações em RAPD quando as amostras testadas tratavam-se de DNA genômico dos espécimes adultos de ciatostomíneos.

Nos produtos obtidos das 6 amostras a partir da reação com o "primer" 3 (OPG - 18) observaram-se 48 bandas, reveladas em gel de poliacrilamida a 6%, distribuídas em 35 posições diferentes (Figura 3). Em nenhuma destas posições encontraram-se bandas em concomitância para 6, 5 ou 4 amostras. Duas posições são compartilhadas entre bandas de 3 amostras (uma por bandas obtidas de *S. edentatus, S. vulgaris* e I_3 de Cyathostominae, outra por bandas de *Triodontophorus sp.*, I_3 de Cyathostominae e *C. elegans*).

A amostra de *S. edentatus* apresentou 8 bandas, das quais uma compartilha igual posição com a banda de *S. vulgaris*, outra com banda de *C. elegans*, e uma terceira, conforme mencionado, concomitantemente com bandas de *S. vulgaris* e de I_3 de Cyathostominae. O padrão obtido com o uso do primer em *S. equinus,* constituiu-se de bandas em 4 posições. Destas, duas idênticas à posições de bandas observadas no produto de *Triodontophorus sp.* e de I_3 de Cyathostominae.

Das 9 bandas apresentadas pelo produto de amplificação do DNA de *S. vulgaris*, duas se distribuem em posições semelhantes à de duas outras apresentadas por I_3 de Cyathostominae e uma correlacionando-se à de *C.*

elegans. Das 3 bandas observadas por *Triodontophorus sp.*, duas não se correlacionam a nenhuma dos padrões observados nos outros organismos. As 11 bandas observadas em I_3 de Cyathostominae, compartilham posições com 6 das 13 verificadas em *C. elegans*.

Nos produtos de RAPD obtidos das 6 amostras utilizando o "primer" 4 (OPG - 19) observou-se em gel de poliacrilamida a 6% (Figura 4), 31 bandas distribuídas em 25 posições. Nenhuma destas posições ocupadas concomitantemente por bandas de 6, 5 ou 4 amostras. Uma posição é compartilhada por bandas pertencentes a 3 amostras (*S. equinus*, I_3 de Cyathostominae e *C. elegans*).

Das 7 bandas apresentadas por produto de *S. edentatus* apenas uma se encontra em posição coincidente a outra de *Triodontophorus sp.*

Duas das 5 bandas apresentadas por produto de *S. equinus* compartilham posições com as de outras amostras. Além daquela posição onde se encontram bandas de I_3 de Cyathostominae e de *C. elegans* , uma banda coincide com a de *Triodontophorus sp.*

O padrão produzido com o uso do "primer" OPG-19 pela amostra de *S. vulgaris* apresenta 3 bandas. Destas, uma coincide com outra de igual localização demonstrada no padrão oferecido por *Triodontophorus sp.*. Este último apresenta perfil de 8 bandas. Dentre as quais, além das mencionadas, duas outras ocupam semelhantes posições a de I_3 de Cyathostominae e de *C. elegans*.

Além da banda coincidente àquela de *S. equinus*, apresentada no perfil de I_3 de Cyathostominae, uma outra é compartilhada por *C. elegans*. Desta amostra 2 das 5 posições de bandas não são compartilhadas.

Os produtos de RAPD obtidos mediante o uso do "primer" 5 (UNB - 63) observados em gel de poliacrilamida a 6%, apresentaram 35 bandas distribuídas em 26 posições. Nenhuma destas posições ocupadas concomitantemente por bandas de 6 ou 5 amostras. Uma posição é ocupada por bandas pertencentes aos produtos de *S. edentatus*, *Triodontophorus sp.*, L_3 de Cyathostominae e *C. elegans*.

O produto de *S. edentatus* revelou 5 bandas das quais 4 compartilham posições com as de outros organismos estudados (duas semelhantes às de *Triodontophorus sp.*, uma à de I_3 de Cyathostominae, e uma à de *C. elegans*).

Das 5 bandas reveladas em produtos de *S. equinus*, 3 não são coincidentes. As duas outras bandas, uma delas correlacionando-se individualmente à banda evidenciada em produto de *Triodontophorus sp.*, e a outra em concomitância com bandas de L_3 de Cyathostominae e *C. elegans*.

Em *S. vulgaris*, foi revelado padrão de 3 bandas em posições não coincidentes às ocupadas pelas das demais amaostras.

O produto de *Triodontophorus sp.* apresentou somente duas bandas, comentadas anteriormente.

Das 5 bandas obtidas em produtos de L_3 de Cyathostominae, somente duas não ocuparam posições coincidentes, duas se assemelharam às de *C.*

elegans e uma ocupou igual posição que as de *S. edentatus*, *Triodontophorus* e *C. elegans*, conforme citado anteriormente.

A partir da soma de observações de presenças ou ausências de bandas reveladas nos géis de poliacrialamida, referentes às amostras submetidas a RAPD com os 3 diferentes "primers", foi elaborada com auxílio do Programa "RAPDistance package" uma matriz numérica representativa das diferenças entre as espécies (Figura 6), onde o valor 1 representa o mais alto grau de diferença observado na análise de pares de espécies. Estes dados numéricos quando submetidos ao Programa UPGMA (Unweighted pair group arithmetic averages) resultaram na construção de um fenograma (Figura 7) representando os graus de similaridade e dissimilaridade entre as amostras comparadas através dos RAPDs.

Observa-se através do fenograma que as três espécies de *Strongylus* encontram-se colocados como geneticamente distantes, havendo maior grau de similaridade entre *Strongylus edentatus* e *Triodontophorus sp.* Identidade maior foi observada entre a amostra de L_3 de Cyathostominae e *C. elegans*. Em relação a estas quatro, a espécie que se demonstrou mais dissimil foi *S. equinus* seguida de *S. vulgaris*, distantes também entre elas.

Observa-se discrepância entre o resultados da análise filogenética realizada em nosso estudo e aqueles obtidos por CHILTON *et al.* (*op. cit.*), os organismos das espécies *Strongylus edentatus* e *S. equinus* são representados, através de igual Programa, como espécies estreitamente correlatas pouco distanciadas de *S. vulgaris*. Embora sejam incipientes os dados acerca da

genética molecular destas espécies, convém lembrar que em nossos estudos aplicamos o DNA genômico na análise. CHILTON *et al.* (*op. cit.*), analisaram seqüências referentes aos produtos amplificados de ITS_2, que como demonstrado nos diversos estudos, trata-se de uma região sujeita à evolução lenta, portanto mais conservada, conforme observação de ZARLENGA *et al.* ($1994_{a\ b}$) para as espécies de Trichostrongylidae. As regiões amplificadas aleatoriamente pela RAPD encontram-se dispersas no DNA genômico dos organismos o que permite maior variabilidade entre os materiais genéticos dos organismos de um mesmo grupo.

Como demonstrado, a grande quantidade de bandas apresentadas nas análises de RAPD em gel de poliacrilamida, de forma não compartilhada pelas espécies, nos leva a confiar em que uma vez isolada uma ou mais bandas específicas presentes em material genético dos organismos, e reconhecida a seqüência de bases desta porção, possam ser desenvolvidas seqüências de oligonucleotídeos iniciadoras de PCR ("primers") que possam ser aplicadas em estudos de identidade de organismos ("DNA – fingerprint", por exemplo).

QUADRO 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS "PRIMERS" UTILIZADOS NA REACÕES DE RAPD.

N°	Nomenclatura	Seqüência de bases (5' - 3')	% de CG	Organismos nos quais foram empregados originalmente/Referência
01	OPG-03	GAGCCCTCCA	70	*Paracoccidioides brasiliensis* (SOARES *et al*, 1995)
02	OPG-16	AGCGTCCTCC	70	Idem
03	OPG-18	GGCTCATGTG	60	Idem
04	OPG-19	GTCAGGGCAA	60	Idem
05	UNB-63	CAGCACCCAG	70	Idem
06	UBC-322	GCCGCTACTA	60	*Ascaris suum* (NADLER *et al*, 1995)
07	UBC-345	GCGTGACCCG	80	Idem
08	UBC-348	CACGGCTGCG	80	Idem
09	OPK-01	CATTCGAGCC	60	Espongiários (RODOLFO ALBANO, com. pessoal)
10	OPK-14	CCCGCTACAC	70	Idem
11	OPK-20	GTGTCGCGAG	70	Idem
12	OPC-02	GTGAGGCGTC	70	Idem
13	OPC-11	AAAGCTGCGG	60	Idem
14	OPS-17	TGGGGACCAC	70	Idem
15	OPR-11	GTAGCCGTAT	50	Idem

QUADRO 2 – QUALIDADE DAS AMPLIFICAÇÕES E QUANTIDADE DE AMOSTRAS AMPLIFICADAS E PELOS "PRIMERS" NAS REAÇÕES DE RAPD. ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6%.

Nomenclatura (nosso nº)	Seqüência de bases (5' para 3')	Amostras amplificadas / amostras testadas	Qualidade de amplificação
OPG-03 (1)	GAGCCCTCCA	2 / 11	+
OPG-16 (2)	AGCGTCCTCC	3 / 11	+
OPG-18 (3)	GGCTCATGTG	7 / 11	+++
OPG-19 (4)	GTCAGGGCAA	7 / 11	++
UNB-63 (5)	CAGCACCCAG	7 / 11	++
UBC-322 (6)	GCCGCTACTA	4 / 11	+
UBC-345 (7)	GCGTGACCCG	2 / 11	+
UBC-348 (8)	CACGGCTGCG	2 / 11	+
OPK-01 (9)	CATTCGAGCC	3 / 11	+
OPK-14 (10)	CCCGCTACAC	0 / 11	-
OPK-20 (11)	GTGTCGCGAG	1 / 11	+
OPC-02 (12)	GTGAGGCGTC	2 / 11	+
OPC-11 (13)	AAAGCTGCGG	1 / 11	+
OPS-17 (14)	TGGGGACCAC	0 / 11	-
OPR-11.(15)	GTAGCCGTAT	2 / 11	+

- Nenhuma amplificação.
+ Amplificação pobre – raras bandas difusas ou indistintas.
++ Amplificação boa – poucas bandas, intensas.
+++ Amplificação ótima – muitas bandas, intensas

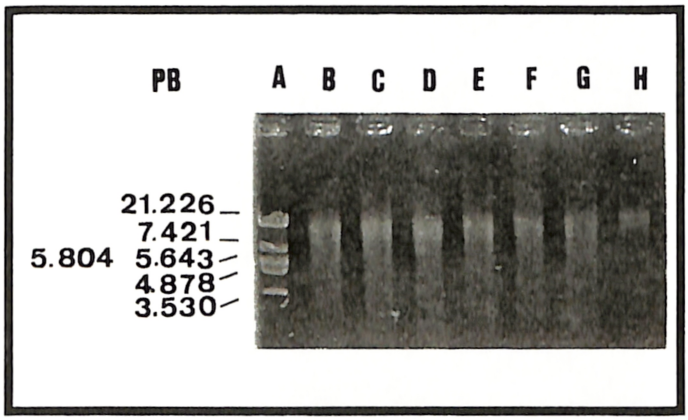

Figura 1 - Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose 1% corado pelo Brometo de etídeo: A - Marcador de peso molecular λ DNA / *Eco* RI; B – *Ascaridia numidae*; C – *Schistosoma mansoni*; D - L_3 de Cyathostominae; E - *Strongylus edentatus*; F - *S. equinus*; G - *S. vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases.

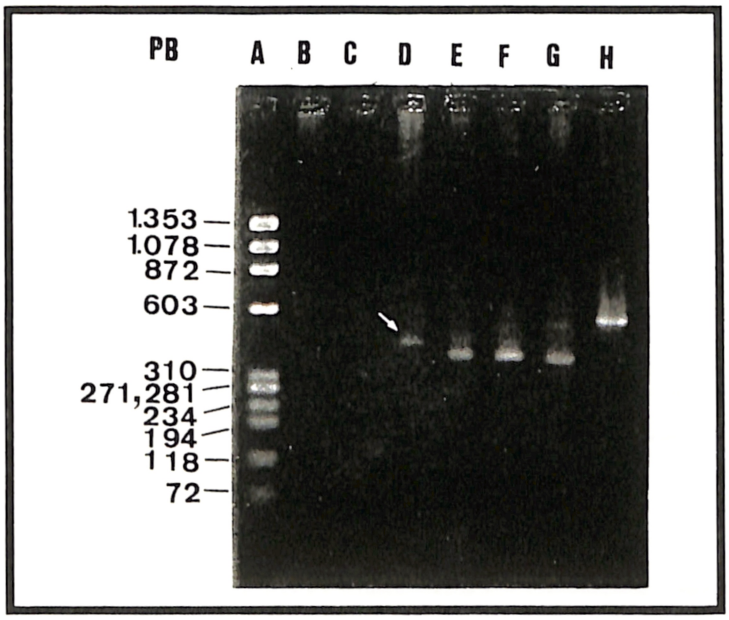

Figura 2 - Eletroforese de produtos de PCR em gel de agarose 2% corado pelo Brometo de etídeo: A - Marcador de peso molecular ϕ x 174 RF DNA / *Hae III*; B - *Ascaridia numidae*; C - *Schistosoma mansoni*; D - L_3 de Cyathostominae; E – *Strongylus edentatus*; F - *S. equinus*; G - *S. vulgaris*, e H – *Caenorhabditis elegans*. PB – Pares de bases.

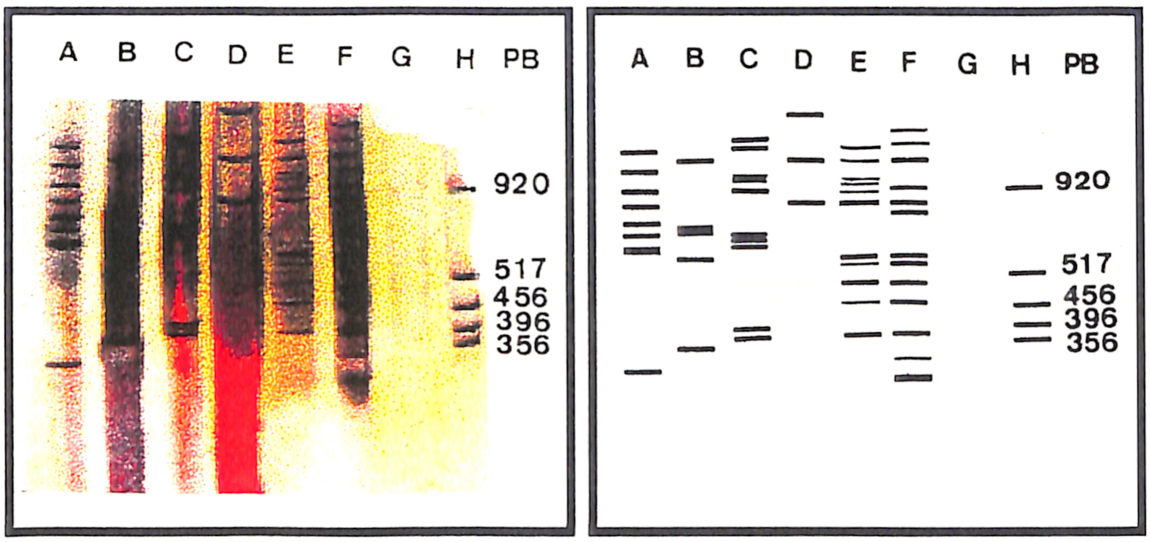

Figura 3 - Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**"primer" 3 –OPG – 18**): A- *Strongylus edentatus*; B - *S. equinus*; C - *S. vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*; G - Controle negativo; H - Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB - Pares de bases.

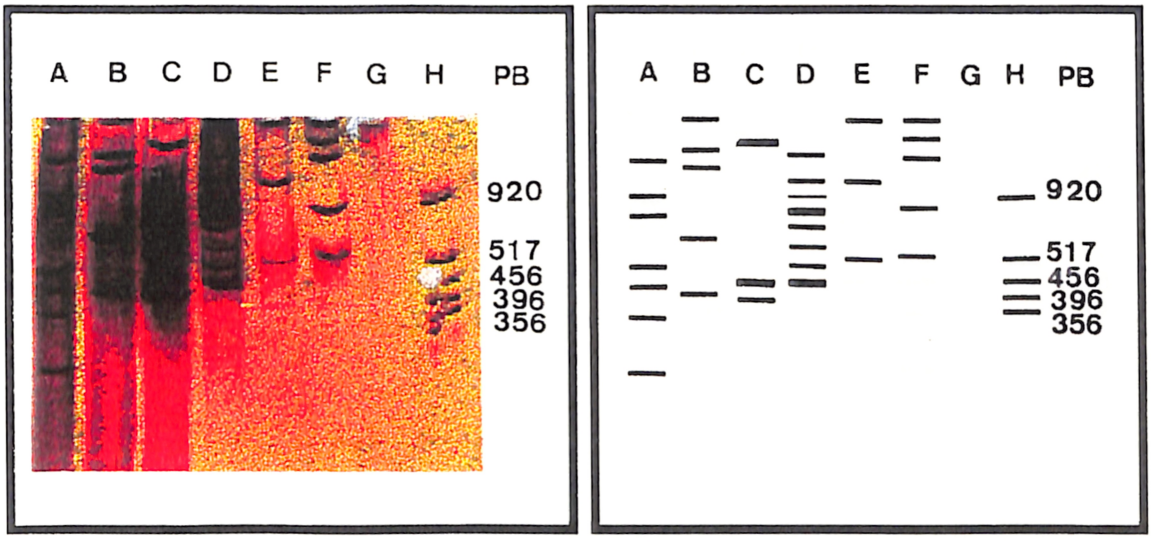

Figura 4 - Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**"primer" 4 –OPG – 19**): A- *Strongylus edentatus*; B - *S. equinus*; C - *S. vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*; G - Controle negativo; H - Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB - Pares de bases.

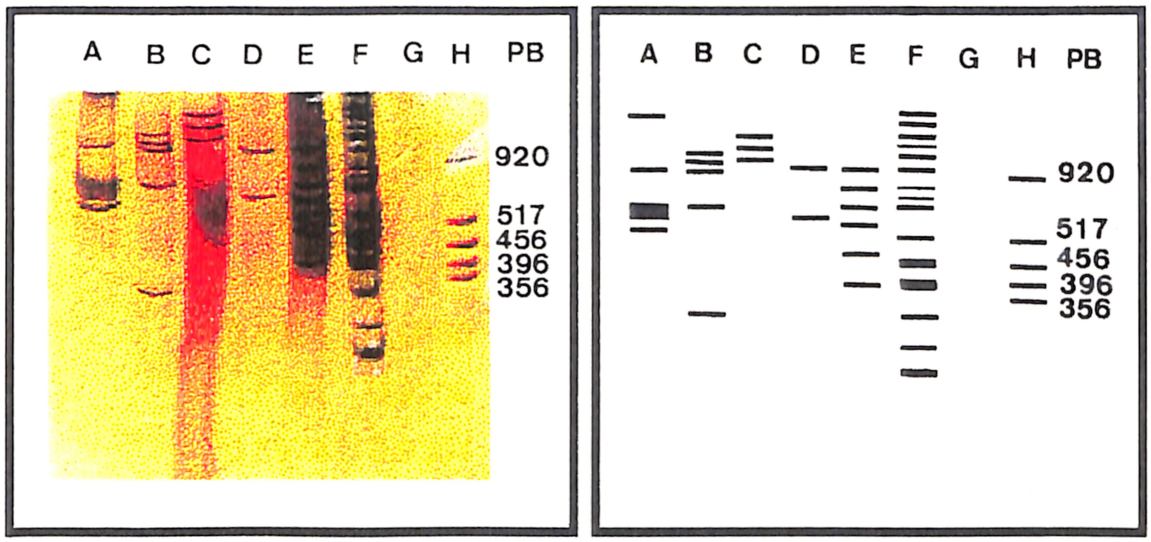

Figura 5 - Perfis eletroforéticos de amplificações aleatórias em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata (**"primer" 5 –UNB – 63**): A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C - *Strongylus vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*; G - Controle negativo; H - Marcador de peso molecular (SK+ / *Hinf* I). PB - Pares de bases.

Amostra	A	B	C	D	E	F
A	0					
B	1,0000	0				
C	0,8888	1,0000	0			
D	0,8181	0,9200	0,9310	0		
E	0,8974	0,9354	0,8857	0,8125	0	
F	0,9245	0,8666	0,9591	0,8695	0,5769	0

Figura 6 – Matriz das distâncias genéticas das espécies, obtida através da análise computacional dos produtos de RAPD analisados em gel de poliacrilamida a 6%. A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C - *Strongylus vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*.

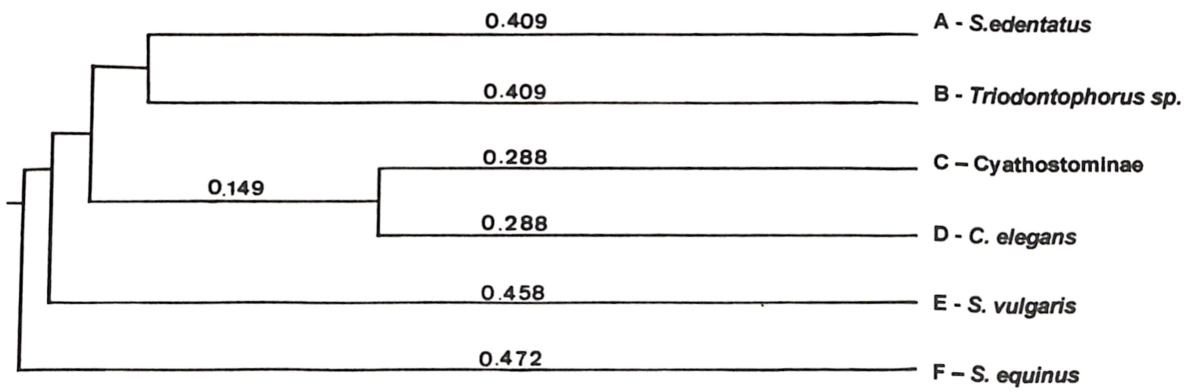

Figura 7 - Fenograma baseado nas distâncias entre os DNAs das amostras, baseado na análise por UPGMA dos produtos de RAPD analisados em gel de poliacrilamida 6%. A- *Strongylus edentatus*; B - *Strongylus equinus*; C - *Strongylus vulgaris*, D - *Triodontophorus sp.*; E- L_3 de Cyathostominae; F - *Caenorhabditis elegans*.

CONCLUSÕES

As dificuldades iniciais de amplificação de produtos de PCR, devido a presença de inibidores, foram sanadas mediante a inclusão de etapa de purificação dos extratos através do uso de colunas de trocas iônicas.

Os produtos de amplificações do segmento ITS_2 através dos "primers" utilizados (ITS_2 A e ITS_2 B), não discriminam as espécies de *Strongylus* estudadas, dado a pouca diferença apresentadas em seus pesos moleculares.

Os organismos de outras espécies (*Schistosoma mansoni* e *Ascaridia numidae* e *Caenorhabitis elegans*) incluídos no estudo, demonstraram resultados satisfatórios em relação ao propósito de sua inclusão.

O uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida seguida da coloração pela prata, devido a sensibilidade, facilitou a visualização de padrões de bandas mais amplos.

A utilização dos "primers" randômicos (OPG - 18, OPG - 19 e UNB-063) para amplificação do DNA genômico , oferece padrões de bandas discriminatórios entre todos os organismos estudados.

A ampliação dos estudos acerca deste grupo de parasitos, através de RAPD, incluindo isolados de diversas localidades poderá oferecer marcadores polimórficos que sejam empregados em análises filogenéticas das espécies.

Estudos posteriores, buscando identificar e seqüenciar bandas espécie-específicas reveladas através dos padrões polimórficos de RAPD das espécies estudadas e outras que lhes sejam correlatas, principalmente os ciatostomíneos, poderá determinar "primers" que sejam empregados em diagnóstico, inclusive de ovos nas fezes e de larvas encontradas nas pastagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. & CONCORDET, D. - Identification of infective larvae of some commom nematode strongylids of horses. **Revue de Médicine Vétérinaire, 144**(12): 989-995, 1993.

BLAIR, D.; AGATSUMA, T.; WATANOBE, T.;OKAMOTO, M. & ITO, A. – Geographical genetic structure within the humam lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences. **Parasitology, 115**: 411 – 417, 1997.

BUCKNELL, D.; HOSTE, H.; GASSER, R. B. & BEVERIDGE, I. – The structure of community of strongyloid nematodes of domestic equids. **Journal of Helminthology, 70**: 185 – 192, 1996.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P. & BOOTHROYD, J. C. – Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology, 27**: 1787 – 1792, 1989.

BRETAGNE, S., GUILLOU, J. P.; MORAND, M. & HOUIN, R. – Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. **Parasitology, 106**: 193 – 199, 1993.

CAMPBELL, A. J. D.; GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. - Differences in a ribosomal DNA sequence of Strongylus species alllows identification of single eggs. **International Journal for Parasitology, 25** (3): 359 – 365, 1995.

CARY, S. C. – PCR – Based method for single eggs and embryo identification in marine organisms. **Biotechniques, 21** (6): 998 – 1000, 1996.

CERE, N.; LICOIS, D. & HUMBERT, J. F. – Comparison of the genomic fingerprints generated by random amplification of polymorphic DNA between precocious lines and parental strains of *Eimeria* spp. from the rabbit. **Parasitology Research, 83**: 300 – 302, 1997.

CHAPMAN, A.; VALLEJO, V.; MOSSIE, K. G.; ORTIZ, D.; AGABIAN, N. & FLISSER, A. – Isolation and characterization of species – specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. **Journal of Clinical Microbiology, 33**: 1283 – 1288, 1995.

CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. & BEVERIDGE, I. – Phylogenetic relationships of australian strongyloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. **International Journal for Parasitology, 27** (12): 1481 – 1484, 1997.

DAME, J. B.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H. & LINDGREN, G. - Cloning and characterization of the ribosomal RNA gene repeat from *Ostertagia ostertagi*. **Molecular and Biochemical Parasitology, 45**: 275 – 280, 1991.

DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; BAKER, V.; EWING, S. A.; STALLKNECHT, D. E.; DAVIDSON, W. R.; KOCAN, A. A.; LOCKHART, J. M. & OLSON J. G. - *Ehrlichia* – like 16 S rDNA sequence from wild white – tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Journal of Parasitology, 82** (1): 52 – 58, 1996.

DEPLAZES, P. ECKERT. J.; PAWLOWSKI, Z. S.; MACHOWSKA, L. & GOTTSTEIN, B. – An enzyme – linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* coproantigens in humans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85**: 391 – 396, 1991.

ELLIS, J. T. - Polymerase chain reaction approaches for detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parastology, 28**: 1053 – 1060, 1998.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P. R.; BRINDLEY, P. J.; NIMMO, K. A. & JOHNSON, A. M. – The phylogeny of *Neospora caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology, 64**: 303 – 311, 1994.

ELLIS, R. E.; SULSTON, J. E. & COULSON, A. R. - The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. **Nucleic Acids Research, 14**: 2345-2364, 1986.

FLISSER, A., REID, A., GARCIA – ZEPEDA, E. & MCMANUS, D. P. – Specific detection of *Taenia saginata* eggs by DNA hybridization. **Lancet, 2**: 1429 – 1430, 1988.

FRASER, A. & CRAIG, P. S. – Dtection of gastrointestinal helminth infection using coproantigen and molecular diagnostic approaches. **Journal of Helminthology, 71**, 103 – 107,1997.

GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. - Characterization of taeniid cestode species by PCR - RFLP of ITS_2 ribosomal DNA. **Acta Tropica, 59**: 31 - 40, 1995.

GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H. & BEVERIDGE, I. - Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. **Nucleic Acids Research, 21** (10): 2525 – 2526, 1993.

GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H & STEVENSON, L. A. - Species identification of Trichostrongyle nematodes by PCR-Linked RFLP. **International Journal for Parasitology, 24** (2): 291 – 293, 1994.

GORDON, H. MCL. & WHITLOCK, A. V. - A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council Scientific Industrial Research Australia, 12** (1): 50 – 59, 1939.

GOTTSTEIN, B. DEPLAZES, P. TANNER, I. & SKAGGS, J. S. – Diagnostic identification of *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85**: 248 – 249, 1991.

GRANT, W. N. & WHITINGTON, G. E. – Extensive DNA polymorphism whitin and between two strains of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology, 24** (5): 719 – 725, 1994.

GUAY, J. M.; DUBOIS, D.; MORENCY, M. J.; GAGNON, S.; MERCIER, j. & LEVESQUE, R. C. – Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology, 31**: 203 – 207, 1993.

GUO, Z. G.; GROSS, U. & JONHSON, A. M. – *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitology Research, 83**: 458 – 463, 1997.

HADRYS, H.; BALICK, M. & SCHIERWATER, B. – Applications of random amplified polymorfic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology, 1**: 55 – 63, 1992.

HARTWICH, G. – [On the *Strongylus tetracanthus* problem and the systematics of the Cyathostominae (Nematoda: Strongyloidea)]. **Miheilungen Zoologischen Museum in Berlin, 62**: 61 – 102, 1986.

HEDRICK, P.- Shooting the RAPDs. **Nature, 355**: 679 – 680, 1992.

HERD, R. P. - The changing world of worms: The size of the cyathostomes and the decline of *Strongylus vulgaris*. **Compendium Continual Education of Practice Veterinary, 12**: 732 – 736, 1990.

HO, M. S. Y.; BARR, B. C.; ROWE, J. D.; ANDERSON, M. L.; SVERLOW, K. W.; PACKHAM, A.; MARSH, A. E. & CONRAD, P. A. –Detection of *Neospora sp.* from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. **Journal of Parasitology, 83** (3): 508 – 514, 1997.

HOLMDAHL, O. J. M. & MATTSON, J. G. – Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of internal transcribed spacer 1. **Parasitology, 112**: 177 – 182, 1996.

HOLMDAHL, O. J. M., MATTSON, J. G.; UGGLA, A. & JOHANSSON, K. E. – The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal DNA sequences. **Microbiology Letters, 119**: 187 – 192, 1994.

HOMAN, W. L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M. & VAN KNAPEN, F. – Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* Isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research, 83**: 285 – 289, 1997.

HOSTE, H.; CHILTON, N. B. ; GASSER, R. B. & BEVERIDGE, I. - Differences in the Second Internal Transcribed Spacer (Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). **International Journal for Parasitology, 25** (1): 75 – 80, 1995.

HOWE, D. K.; VODKIN, M. H.; NOVAK, R. J.; VISVESVARA, G. & MCLAUGHLIN, G. L. – Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthomoeba spp.* **Parasitology Research, 83**: 345 – 348, 1997.

HUNG, G.-C.; CHILTON, N. B.; BEVERIDGE, I.; McDONNELL, A.; LICHTENFELS, J. R. & GASSER, R. B. – Molecular delineation of *Cylicocyclus nassatus* and *C. ashworthi* (Nematoda: Strongylidae). **International Journal for Parasitology, 27** (5): 601 – 605, 1997.

HUNG, G.-C.; JACOBS, D. E.; KRECEK, R. C.; GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. – *Strongylus asini* (Nematoda, Strongyloidea): Genetic relationships with other *Strongylus* species determinated by ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology, 26**: 1407 – 1411, 1996.

JACOBS, D. E.; ZHU, X.; GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. – PCR - based methods for identification of potencial zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. **Acta Tropica 68**: 191 – 200, 1997.

JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A.; CHRISTENSEN, C. M.; BJORN, H. & NANSEN, P.- Use of random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction for the definition of genetic markers for species and strains of porcine *Oesophagostomum*. **Parasitology Research, 83**: 646 – 654, 1997.

JOHNSON, M. J.; BELINKE, J. M. & COLES, G. C. – Detection of gastrointestinal nematodes by coproantigen capture ELISA. **Research in veterinary Sciense, 60**: 7 – 12, 1996.

KATAKURA, K.; LUBINGA, C.; CHITAMBO, H. & TADA, Y. – Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. **Parasitology Research, 83**: 241 – 245, 1997.

KRÁL'OVÁ, I. – A total characterization in *Proteocephalus exiguus* and *P. perca* (Cestoda : Proteocephalidae) : random amplified polymorphic DNA and Hibridizaton techniques. **Parasitology Research, 82**: 668 – 671, 1996.

LICHTENFELS, J. R. - Helminths of domestic equids. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 42**: special issue; 92 pp., 1975.

LUN, Z. R. & DESSER, S. S. – Analysis of isolates whitin species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. **Parasitology Research**, 82: 22 – 27, 1996.

MATHIS, A., DEPLAZES, P. & ECKERT, J. – An improved test system for PCR – based specific detection of Echinococcus multilocularis eggs. **Journal of Helminthology, 70**: 219 – 222, 1996.

MCGRAW, B. M. & SLOCOMBE, J. O. F. - *Strongylus vulgaris* in the horse: A review. **Canadian Veterinarian Journal, 17**(6):150-157, 1976.

NADLER, S. A., LINDQUIST, R. L. & NEAR, T. J. - Genetic structure of midwestern *Ascaris suum* populations: A comparison of isoenzyme and RAPD markers. **Journal of Parasitology, 81** (3): 385 – 394, 1995.

NEI, M. & LI, W. H. - Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of National Academy of Science 76**: 5269 – 5273, 1979.

NEWTON, L. A.; CHILTON, N. B.; BEVERIDGE, I.; HOSTE, H.; NANSEN, P. & GASSER, R. B. - Genetic markers for strongylid nematodes of livestock defined by PCR - based restriction analysis of spacer $_{R}$DNA. **Acta Tropica, 69**: 1 – 15, 1998.

NICHOL, C. & MASTERSON, W. J. - Caracterization of surface antigens of *Strongylus vulgaris* of potencial immunodiagnostic importance. **Molecular and Biochemistry Parasitology, 56**: 323 – 328, 1987.

OGBOURNE, C. P. – The prevalence, relative abundance and site distribution of nematode of subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. **Journal of Helminthology, 50**: 203 – 214,1976.

PARMLEY, S. F.; GOEBEL, F. D. & REMINGTON, J. S. – Detection of *Toxoplasma gondii* on cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology, 30**: 3000 – 3002, 1992.

PAYNE, S. & ELLIS, J. – Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology, 26** (4): 347 –351, 1996.

PILLAY, D. & PILLAY, B. – Random amplified polymorphic DNA analysis shows intraspecies variation among *Shistosoma mansoni* isolates. **Medicine Science Reaearch, 22**: 369 – 371, 1994.

REY, L. – **Parasitologia**. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,1991.

RISHI, A. K. & MCMANUS, D. P. – Molecular cloning of *Taenia solium* DNA and characterization of taeniid cestodes by DNA analysis. **Parasitology, 97**: 161 – 176, 1987.

ROBERTS, F. H. S. & O'SULLLIVAN, P. J. - Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research, 1** (1): 99 – 102, 1950.

RODRIGUES, M. L. A.; SOUTO-MAIOR, M. P.; ANJOS, D. H. S. & OLIVEIRA, M. D. L. - Comparação entre técnicas de McMaster e centrifugo flutuação para contagem de ovos de helmintos intestinais de eqüinos. **Revista da Universidade Rural, série Ciências da Vida 17** (2):101-102, 1995.

ROMSTARD, A.; GASSER, R. B.; NANSEN; P. POLDERMAN, A. M.& CHILTON, N. B. – *Necator americanus* (Nematoda: Ancylostomatidae) from Africa and Malaysia have different ITS_2 $_R$DNA sequences. **International Journal for Parasitology, 28**: 611 – 615, 1998.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F. & MANIATIS, T. - **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.1989.

STEINDEL, M.; NETO, E. D.; PINTO, C. J. C.; GRISARD, E. C.; MENEZES, C. L . P.; MURTA, S. M. F.; SIMPSON, A. J. G. & ROMANHA, A. J. – Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis *of Trypanosoma rangeli* strains. **Journal of Eukariotic Microbiology, 41**: 261 – 267, 1994.

STEVENSON, L. A.; CHILTON, N. B. & GASSER, R. B. - Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the Ribosomal DNA Second Internal Transcribed Spacer. **International Journal for Parasitology, 25** (4): 483 – 488, 1995.

UENO, H. & GONÇALVES, P. C. - **Manual para diferenciação das helmintíases de ruminantes**. 3ª Ed., Japan International Cooperation Agengy. 1994. 166 p.p.

WATT, D.; SPARAGANO, O.; BROWN, C. G. D. & WALKER, A. R. - Use of the polymerase chain reaction for identification and quantification of *Theileria parva* protozoa in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Parasitology Research, 83**: 359 – 363, 1997.

WELSH, J. & MCCELLAND, M. - Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research, 18**: 7213 - 7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. P.; LIVAK, K. J.; RAFALKI, J. A. & TINGEY, S. V.- DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research, 18:** 6531 – 6535, 1990.

WU, Z.; NAGANO, I.; DONG, X. & TAKAHASHI, Y. - Primers for polimerase chain reaction to detect genomic DNA of *Toxocara canis* and *T. cati*. **Journal of Helminthology, 71**: 77 -78, 1997.

ZARLENGA, D. S., LICHTENFELS, J. R. & STRINGFELLOW, F. - Cloning and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from *Nematodirus battus*. **Journal of Parasitology, 80** (2): 342-344, 1994_a.

ZARLENGA, D. S.; STRINGFELLOW, F.; NOBARY, M. & LICHTENFELS, J. R. - Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. **Experimental Parasitology, 78**: 28 – 36, 1994_b.

Anexo I

RESULTADOS DOS EXAMES DE FEZES DOS EQUÍDEOS

(OPGs E COPROCULTURAS)

Animal	OPG McMaster	N° de ovos (50 μl)	Ovos em sol. de açucar (40ml)	N° de larvas (250 ml)	Identificação das larvas (percentual)
638	2.350	13	10.400	5.000	Cyathostominae (100%)
730	7.050	176	140.800	67.500	Cyathostominae (100%)
734	2.100	16	12.800	52.500	Cyathostominae (100%)
742	2.250	12	9.600	137.500	Cyathostominae (100%)
760	3.25	62	49.600	62.500	Cyathostominae (100%)
774	2.850	07	5.600	37.500	Cyathostominae (100%)
775	4.000	21	16.800	137.500	Cyathostominae (100%)
782	1.650	-	-	20.000	Cyathostominae (57%)
				12.500	*Strongylus vulgaris* (36%)
				5.000	*S. equinus* (7%)
783	4.500	36	28.800	70.000	Cyathostominae (100%)
784	1.700	21	16.800	10.000	Cyathostominae (100%)
Malhada	4.600	-	-	75.000	Cyathostominae (96%)
				5.000	*S. vulgaris* (4%)
Caidinha	4.650	156	124.800	25.000	Cyathostominae (100%)
Cara branca	4.750	114	91.200	15.000	Cyathostominae (100%)

Anexo II

TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO[4]

1) Macerar os helmintos em um gral com auxílio de pistilo, ambos limpos e autoclavados. Procurar abreviar o tempo de maceração para evitar a ação das endonucleases.

2) Aliquotar o macerado utilizando alças de plástico individuais, aproximadamente 100 µl em cada microtubo Eppendorf®.

3) Ressuspender o conteúdo do microtubo em 400 µl de solução Tris 10 mM / EDTA 1 mM – pH 7,5[5].

4) Acrescentar 25 µl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)[6] 10% para concentração final de 0,5 %.

---

[4] Como nos demais procedimentos laboratoriais o uso de luvas é imprescindível nesta etapa devido à possibilidade de contaminação das amostras e ação de endonucleases, ainda de contaminação química do manipulador.

[5] O Tris, estabiliza o pH e o EDTA quela íons divalentes como Ca^{+} e Mg^{+}.

[6] O SDS desnatura as proteínas (histonas) e emulsiona os lipídeos, removendo-os. Promove a lise das células.

5) Adicionar 2 μl de Proteinase K - Sigma®. Concentração final 100 μg / ml (Solução estoque 25 mg / ml).

6) Incubar por duas horas em Banho-maria a 56°C.

7) Adicionar 200 μl de fenol tamponado[7] em Tris (pH 7,8)

8) Juntar 200 μl de clorofórmio[8], agitar até ficar leitoso.

9) Centrifugar a 14000 RPM por 3 minutos (em microcentrífuga Eppendorf®).

10) Aspirar 300 μl do sobrenadante, com cuidado para não agitar o sedimento.

11) Repetir os procedimentos 7, 8, 9 e 10 por mais duas vezes.

12) Retirar da última centrifugação 300 μl do sobrenadante, colocá-los em um microtubo e adicionar 33 μl de acetato de sódio 3 M[9]. Concentração final 0.3 M (pH 5,2)

13) Adicionar 2,5 X volume de etanol absoluto[10], ou seja, 750 μl.

14) Centrifugar a 14000 RPM por 3 minutos.

15) Desprezar o sobrenadante.

16) Lavar o sedimento com 1 ml de etanol 70%, sem ressuspendê-lo.

17) Centrifugar a 14000 RPM por 5 minutos.

---

[7] O fenol tamponado deve ser acondicionado em tubo tipo Falcon® envolto em papel alumínio, e guardado em geladeira.

[8] Fenol / clorofórmio, remove proteínas e as sedimenta.

[9] Pode ser utilizado o Acetato de Amônio. Inverte a polaridade, precipitando o DNA.

[10] Retira o fenol completamente e solubiliza o DNA. Após a adição do etanol, geralmente observa-se a formação de um "enovelado"que indica a presença de DNA.

Anexo III

ELETROFORESE EM MINI-GEL DE AGAROSE

1) Protocolar o experimento, registrando dados referentes às amostras, data e condições de corrida.

2) Preparar as amostras: 10 μl do extrato + 2 μl do corante de corrida (Tampão de carregamento), misturados sobre Parafilm M®.

3) Aplicar as amostras (12 μl) nos poços correspondentes no gel já coberto pelo tampão de corrida (TBE 1X) no interior da cuba de eletroforese.

4) Utilizar um dos poços para aplicação do padrão de peso molecular.

5) Conectar os cabos à fonte, observando a polaridade.

6) Proceder a corrida nas seguintes condições: 50 volts, ≅140 mA (miliamperes), por cerca de 70 minutos.

Anexo IV

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6%

Preparação do gel de poliacrilamida a 6%:

Aplica-se a seguinte equação para o cálculo do volume de uma solução de Acrilamida[13] a 30% (Solução estoque) a ser utilizado para concentração desejada de 6% num volume final de 12 ml (para dois mini-géis de 0,75 mm de espessura / Sistema Mini-Protean II - BIORAD®):

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ (Volume a ser usado vezes concentração conhecida, é igual a volume final vezes concentração desejada) $\Rightarrow V_1 \times 30 = 12 \times 6 \Rightarrow V_1 \times 30 = 72 \Rightarrow V_1 = 72 \div 30 \Rightarrow V_1 = 2,4$ (volume da solução de acrilamida a 30% a ser utilizado).

Acrilamida Sigma® a 30%..... 2,4 ml

TBE 5X..... 2,4 ml

Água 7,2 ml

deionizada.....

Sol. de Persulfato de Amônio 10 60 µl

%.....

TEMED[14] Sigma®..... 6 µl

Com auxílio de pipeta preencher com a mistura acima os espaços entre as placas de vidro do sistema Mini-Protean II - BIORAD®, evitando a formação e bolhas, e colocando o pente molde dos poços de aplicação das amostras. A polimerização em geral ocorre após 1 hora.

Aplicação das amostras e execução da eletroforese:

1) Protocolar o experimento, registrando dados referentes às amostras, data e condições iniciais de corrida.
2) Retirar cuidadosamente o pente molde do gel de poliacrilamida, removendo os resíduos líquidos contidos nos poços com auxílio de seringa e agulha de ponta romba 25 x 7 mm.

---

[13] A acrilamida é uma substância neurotóxica, devendo ser o procedimento realizado com as devidas precauções. Aconselha-se o uso de máscara, especialmente durante a sua pesagem, e de luvas durante o manuseio da substância e da solução.

[14] N-M-M'- Tetranetil-etileno diamina. Catalisador da polimerização da acrilamida.

3) Lavar por 2 ou 3 vezes os poços com água deionizada.

4) Preparar as amostras: 10 μl do extrato + 2 μl do corante de corrida (Tampão de carregamento), misturados sobre Parafilm M®.

5) Aplicar as amostras (12 μl) nos poços correspondentes no gel já coberto pelo tampão de corrida.

6) Utilizar um dos poços para aplicação do padrão de peso molecular.

7) Conectar os cabos à fonte, observando a polaridade.

8) Proceder a corrida nas seguintes condições: 100 volts (voltagem fixa), amperagem entre de 40 a 17 mA e por tempo variável (cerca de 70 minutos).

9) Ao término da corrida, anotar no protocolo as condições finais de como amperagem e tempo decorrido.

10) Retirar o gel do sistema e levá-lo ao fixador (metanol / ácido tricloracético) utilizado na coloração pela prata.

Anexo V

COLORAÇÃO DE DNA PELA PRATA AMONIACAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA

1) Fixar o gel de eletroforese em poliacrilamida em 200 ml de solução 50% de metanol, 10% de ácido tricloracético (TCA) por 30 minutos.

2) Lavar 2 X (duas vezes) com 200 ml de solução 5% de ácido acético - 10% etanol por 20 minutos.

3) Lavar 2 X (duas vezes) com 250 ml de etanol 10% por 10 minutos.

4) Impregnar o gel com a solução de prata amoniacal (Preparada preferencialmente no dia anterior).

5) Lavar com 300 ml de H_2O deionizada por 5 minutos.

6) Revelar o gel com 300 ml de solução a 0,01% de ácido cítrico, contendo 450 μl de formaldeído a 35%. Quando a revelação estiver

completa as bandas aparecerão marrom escuras ou pretas contra um fundo amarelo.

7) Parar a revelação embebendo o gel em etanol 20% - ácido acético 5% por 10 minutos.

8) Lavar o gel 3 X (três vezes) em 250 ml de etanol 20%. Caso seja necessário o gel poderá permanecer nesta solução.

Anexo VI

TÉCNICA DE SECAGEM DO GEL DE POLIACRILAMIDA

1) Deixar o gel de poliacrilamida por 20 minutos sob agitação branda na solução de secagem (glicerol a 1% em metanol).

2) Durante este tempo deixar quantidade suficiente de papel celofane (Marca Catavento® de preferência) imersa em H_2O deionizada ou destilada.

3) Envolver o gel com o papel, umedecendo-o, utilizado como anteparo uma placa de vidro.

4) Eliminar as bolhas e prender as bordas do papel à placa com grampos (tipo prancheta).

5) Após 24 horas o gel estará completamente seco.

Anexo VII

FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

a) Gel de agarose a 1%:

Agarose (Tipo V – High Gelling / Sigma®)..... 0,2 g

Solução Tris – Borato – EDTA 1 X..... 20 ml

a) Pesar a agarose em um copo de Becker pequeno (50 ml) [15].

b) Adicionar 20 ml de TBE 1X.

c) Dissolver em Banho-maria fervente.

d) Resfriar a ± 55°C e adicionar 1 µl de solução de brometo de etídeo[16,17] (0,5 µg / ml).

e) Transferir a solução para a placa suporte, devidamente nivelada e portando o pente molde para dos poços. Aguardar a gelificação.

f) Retirar o pente e as laterais da placa suporte.

g) Transferir a placa para a cuba de eletroforese, cobrindo o gel com o mesmo tampão do seu preparo (TBE 1X).

---

[15] De acordo com as amostras a concentração de agarose varia de 0,4 a 1 % (DNA genômico), e em 1,5 % e 2 % (produtos de PCR).

b) Tampão de carregamento ("Loading Buffer" 6X):

Azul de Bromofenol.....	0,025 g
Xilenocianol.....	0,025 g
Glicerol.....	*2 ml*
Água deionizada.....	8 ml

Dissolver os corantes sob forte agitação (em vortex).
Adicionar o glicerol e deixar sob agitação branda por cerca de 3 horas. Aliquotar em pequenos volumes e estocar no congelador.

c) Tampão Tris – Borato – EDTA / TBE pH 8.3 (Solução estoque / 5 X concentrada):

EDTA 0,5%.....	20 ml
Ácido Bórico.....	27,5 g
Tris base (Sigma®).....	54 g
Água deionizada.....	1.000 ml

[16] De preferência deve-se "corar"o gel com o brometo de etídeo após a corrida, deixando-o por cerca de 30 minutos imerso, sob agitação, em solução a 0,5µg / ml.

d) Solução Tris 10 mM / EDTA 1 mM pH 7.5 (Estoque / 10X concentrada):

Tris/HCl 1M (pH 8,0).....	1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0).....	200 µl
Água deionizada.....	10 ml

Para uso (1X) diluir 1/10.

e) Solução de Nitrato de Prata Amoniacal:

NaOH 0,1 M.....	40 ml
NH_4OH concentrado.....	3 ml
Ag NO_3 10%.....	10 ml

Misturar até ser dissolvido o precipitado preto.
Ajustar o volume final com D H_2O para 200 ml.

f) Solução de secagem do gel de poliacrilamida:

Metanol.....	50 %
Glicerol.....	0,5%
H_2o destilada.....g.s.p.	1000 ml

[17] Substância mutagênica. Usar luvas ao manuseá-la.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (STRONGYLOIDEA: STRONGYLINAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

A. N. DUARTE[1,3], M. L. A. RODRIGUES[1], A. R. BELLO[2], H. MOURA[2] & L. F. FERREIRA[3].

(1) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituo de Biologia, Centro de Pós-Graduação em Medicina Veterinaria - PV . Seropédica - RJ, Brasil 23.851-970. (2) Universidade Estadual do Rio de Janeiro - FCM - DEP. PAT. & LAB. - Rio de Janeiro - RJ; (3) FIOCRUZ - ENSP - Rio de Janeiro - RJ.

SUMÁRIO: No presente estudo são empregadas técnicas moleculares visando amplificar através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), o segundo espaço interno transcrito (ITS-2) do DNA ribossomal de *Strongylus spp.*, e comparar os mesmos aos de organismos correlatos, sugerindo metodologia que permita o diagnóstico específico. A amplificação de DNA genômico de vermes adultos e de formas larvares com oligonucleotídeos definidos a partir da seqüência ITS-2 de *Caenorhabditis elegans*, resultou em seqüências com cerca de 240 pares de bases nucleotídicas. Foram também incluídos no estudo, como grupos externos, os DNAs de *Schistosoma mansoni* e *Ascaridia numidae* . Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de aplicação desta tecnologia no diagnóstico desejado, embora ocorra a necessidade de estudos adicionais que permitam a definição de novas seqüências iniciadoras da reação de PCR que apresentem maior poder de discriminação espécie-específica.

PALAVRAS - CHAVE: *Strongylus*, Identificação de espécies, ITS-2, RFLP-PCR, Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Nematóides pertencentes a família *Strongylidae* são parasitos de cavalos e outros eqüídeos. Cerca de 56 espécies desta família são citadas para estes hospedeiros. Os gêneros *Strongylus* (com as espécies *S. vulgaris, S. edentatus e S. equinus*) *Oesophagodontus, Triodontophorus* e *Craterostomum* estão compreendidaos na sub-família *Strongylinae*, os demais pertencem à sub-família *Cyathostominae* (LICHTENFELS, 1975). Os ciatostomíneos representam cerca de 95% de prevalência, enquanto os estrongilíneos cerca de 5% (HERD,1990). Dentre os nematóides citados, *S. vulgaris* é a espécie que apresenta maior patogenicidade (SOULSBY,1982), também a mais freqüente do seu gênero (LICHTENFELS, 1975), embora raramente ocorra em grande número em um único animal (NICHOL & MASTERSON, 1987). Tal patogenicidade é atribuída à migração das formas larvares, que resulta em danos a tecidos de diversos orgãos. Os danos são mais evidenciados no sistema arterial mesentérico, onde ocorre a instalação das larvas de 4o estágio e jovens, causando aneurismas e conseqüentemente bloqueio da circulação , resultando em cólicas, hemorragias, enfraquecimento e em alguns casos na morte do hospedeiro (MCGRAW & SLOCOMBE, 1976).

Habitualmente o diagnóstico das infecções por *Strongylus* é feito através do exame de fezes dos eqüinos. Para tanto, são empregadas técnicas de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON & WHITLOCK, 1939; RODRIGUES *et alii*,1996) e cultivo de larvas (ROBERT'S & O'SULLIVAN,1950), não sendo possível a diferenciação das espécies de estrongilídeos pela análise morfométrica dos ovos. Esta é alcançada através da observação das larvas de 3o estágio encontradas nas culturas de fezes de 7 a 14 dias após a coleta.

O desenvolvimento de metodologias sensíveis para o diagnóstico das infecções verminóticas é um importante recurso para a adequação do manejo e controle destas. Também, a rápida evidenciação de formas imaturas (ovos e/ou larvas) dos parasitos na pastagem ou nas fezes do hospedeiro, possibilita a agilização das medidas preventivas.

Testes bioquímicos e imunológicos indiretos têm sido avaliados (NICHOL & MASTERSON, 1987; SOULE, 1990), porém sem demonstrar resultados confiáveis para o diagnóstico gênero ou espécie-específico.

Diferentes nematóides parasitos têm sido identificados através da tecnologia dos ácidos nucléicos (DAME *et alii*, 1991; ZARLENGA *et alii*, 1994; STEVENSON *et alii*,1995). Para tal finalidade, a utilização do RNA e DNA ribossomais (RRNA e RDNA) demonstra ser de maior aplicabilidade pela

sua abundância nos organismos e por sua pouca ou nenhuma variação intraespecífica . Isto ocorre principalmente com o segundo espaço interno transcrito (ITS-2) do RDNA, conforme evidenciado em tricostrongilideos (GASSER *et alii*, 1994; HOSTE *et alii*, 1995).

Estudos têm sido feitos visando verificar as diferenças entre as seqüências ITS-2 de DNA das espécies do gênero *Trichostrongylus* (GASSER *et alii*,1993) e das espécies do gênero *Strongylus* (CAMPBELL *et alii*, 1995). Porém, ocorre a necessidade de maiores esforços para a definição de seqüências iniciadoras de polimerização de DNA ("primers") espécie-específicos, possibilitando assim o diagnóstico mais rápido e seguro.

O presente estudo busca ampliar as observações sobre as seqüências ITS-2 de *Strongylus spp.*, comparando-as às de outros organismos filogeneticamente próximos a este gênero, eliminando assim possíveis dúvidas no diagnóstico molecular das espécies em questão. Também, através da elaboração de "primers" espécie-específicos, sugerir metodologia que possibilite o diagnóstico dos ovos e larvas nas fezes e/ou na pastagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos parasitos adultos: Foram obtidos espécimes adultos pertencentes ao gênero *Strongylus* em necrópsias de eqüinos fêmeas sem raça definida (SRD), realizadas no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Outros foram coletados de eqüinos (SRD) de ambos os sexos abatidos no Frigorífico King Meat S.A. em Londrina (Paraná). Após a remoção dos vermes do intestino grosso dos hospedeiros, processou-se a lavagem dos mesmos em solução fisiológica e a identificação através da morfologia, sem diafanização, de acordo com LICHTENFELS (1975), e a preservação por congelamento (-20 °C) até serem submetidos à extração do DNA.

Obtenção das larvas: Foram realizados OPG e larvacultura de 13 amostras fecais de eqüinos adultos sem raça definida, provenientes do campus da UFRRJ, utilizando, consecutivamente, as técnicas de contagem de ovos de GORDON E WITHLOCK (1939) e de coprocultura (ROBERT'S e O'SULLIVAN, 1950).

As larvas recuperadas das culturas foram identificadas segundo BEVILAQUA *et alii* (1993). O número total de larvas foi estimado à partir de contagem em aliquota de 100µl. Após a contagem, o excedente foi concentrado por sedimentação e transferido para microtubos.

Extração do DNA genômico: A extração do DNA genômico obedeceu basicamente o protocolo de SAMBROOK *et alii*. (1989), com ligeiras modificações. Os organismos utilizados foram aqueles provenientes do Estado do Rio de Janeiro, exceto *S. equinus*, oriundos do Estado do Paraná. Isolados com cerca de 23 vermes adultos de cada espécie foram submetidos à maceração rápida, até formar massa homogênea . Cada 100µl do macerado, por espécie, foi ressuspenso em 400µl de solução 100 mM de Tris / 10 mM de EDTA, 2,5µl de dodecil sulfato de sódio (SDS), 100µg de proteinase K, homogeneizado em agitador mecânico e incubado em banho-maria à 56 °C por 2 horas. Após este período à suspensão foram adicionados 200µl de fenol tamponado (pH 7,8) e 200 µl de clorofórmio e, após suave agitação por inversão do microtubo, a preparação foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min. em microcentrífuga . Do sobrenadante foram aspirados 300ml e repetida por duas vezes a extração com fenol / clorofórmio. Finda a última centrifugação, foram transferidos 300µl do sobrenadante para novo microtubo e a estes adicionados 33µl de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 800µl de etanol absoluto. Após nova centrifugação o sedimento era ressuspenso em 1000 µl de etanol 70%, e novamente cetrifugado como acima decrito. O sobrenadante era decantado, e o microtubo invertido sobre papel absorvente a fim de se promover a completa secagem do sedimento. A seguir este era ressuspenso em 150 µl de Solução 10 mM de Tris / 1 mM de EDTA.

Aplicou-se o procedimento citado anteriormente em macerados obtidos à partir de 6 espécimes de *Ascaridia numidae*, 150 espécimes de *Schistosoma mansoni* quantidades estimadas em 25.000 larvas de Cyathostominae.

Eletroforese dos extratos de DNA genômico: Dos extratos obtidos, 10µl eram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo (0,5µg / ml). A amostra era corada pelo tampão de carregamento 6 x (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 20% glicerol / 2µl por amostra). O tampão utilizado era de borato-EDTA (TBE) 1x (100 mM Tris-borato e 1 mM EDTA / pH 8,0)e as condições de corrida foram: 50 volts (≅ 140 mAmp) por 90 min., em gel de agarose à 0,8%. Utilizamos como marcador de peso molecular DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima *Eco* RI. A presença de bandas com cerca de 20 ng de DNA era visualizada por transluminação do gel por radiação ultravioleta.

Reação em cadeia da Polimerase (PCR): As sequências iniciadoras de polimerização do DNA (primers) utilizadas no experimento foram definidas à partir do segmento ITS-2 de *Caenorhabditis elegans* (Genebank no XO 3680) (Ellis *et alii*, 1986) e denominadas ITS-2A: TTAGTTTCTTTTCTCCGCT e ITS-2B: TGAAATTTCGAACGAAT. A solução 1 (master-mix) utilizou: 5µl de tampão diluidor de Taq DNA polimerase 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,4 / 50 mM KCl / 2,5 mM Mg Cl2), 1µl (200 µM) de cada desoxirribonucleotideo (dT, dC, dG e dA), 5µl (1µM) de ITS2-A e , 5µl (1µM) de ITS2-B.

Da solução 1 foram aliquotados 19 µl para cada tubo de

reação. A este volume somaram-se 1 µl da amostra a ser testada (exceto no tubo de controle negativo, no qual este volume fora substituído por água deionizada estéril), 29,5 µl de água deionizada estéril (30,5 µl no controle negativo) e 50 µl de óleo mineral. Além do controle negativo, incluímos entre as amostras a serem testadas, extratos de DNA de *Schistosoma mansoni*, *Ascaridia numidae* e de larvas de Cyathostominae como grupos externos. Foi incluído também, amostra de DNA de *Caenorhabditis elegans*, como controle positivo. Assim, o preparo era levado à termocicladora de DNA (Perkin Elmer Cetus 4800), estabelecendo primeiramente uma partida quente (98 °C 2 min.) e repouso a 94 °C pelo tempo necessário para colocação da enzima Taq DNA polimerase (0,5 µl para cada tubo 2,5 unidades Perkin Elmer). Logo após iniciavam-se os ciclos térmais: Desnaturação a 94°C por 1 min.; Anelamento a 55°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min., num total de 30 ciclos.

Eletroforese dos produtos de PCR: Analisamos 20% do volume dos produtos de PCR (10 µl) corados pelo tampão de carregamento 6x e submetidos a eletroforese em gel de agarose nas seguintes condições de corrida: 87 volts, ≅ 140 mA, durante 70 minutos, em gel de agarose 2,0% corado pelo brometo de etídeo (0,5 µg µl) utilizando tampão borato-EDTA (TBE) 1X, e como padrão de peso molecular DNA do bacteriófago ΦX 174 RF digerido com a enzima *Hae* III. A visualização era feita por transluminação do gel por radiação ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das necrópsias realizadas no campus da UFRRJ foram recuperados 102 espécimes adultos de *S. vulgaris* (70 fêmeas e 32 machos) e 23 da espécie *S. edentatus* (15 fêmeas e 8 machos). Daqueles procedentes de Londrina, 31 foram identificados como *S. equinus* (16 fêmeas e 15 machos), 288 como *S. edentatus* e 56 como *S. vulgaris* (48 fêmeas e 8 machos).

As larvas cultivadas foram assim identificadas: Em 10 amostras somente larvas de *Cyathostominae*, em 2, larvas de *Cyathostominae* e *S. vulgaris*, e em 1 larvas de *Cyathostominae*, de *S. vulgaris* e de *S. equinus*. As quantidades obtidas dos sedimentos variaram de 2.500 a 137.500 larvas.

Como resultado da extração de DNA genômico revelaram-se em gel de eletroforese, bandas em torno de 21.000 pares de bases, compatíveis com moléculas de DNA de alto peso molecular (Figura 1).

Através da reação em cadeia da polimerase, obtivemos produtos amplificados de seqüências de DNA com cerca de 240 pares de bases para as amostras oriundas do gênero *Strongylus*, já demonstrado anteriormente para produtos amplificados de estrongilídeos da Austrália (CAMPBELL *et alii*, 1995). Nossos dados ampliaram as informações ao demonstrarem com esta análise a presença de produtos amplificados com pesos moleculares semelhantes em extratos de DNA oriundos de larvas de *Cyathostominae*, e a ausência em *S. mansoni* e *A. numidae*, incluídos como controles negativos por se tratarem de grupos externos. Obtivemos amplificação de igual seqüência em DNA genômico de *C. elegans* (controle positivo), o que demonstra a confiabilidade dos resultados (Figura 2).

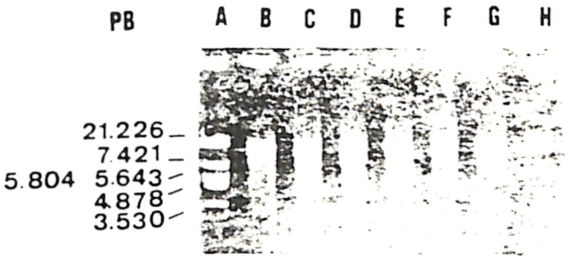

Figura 1 - (Eletroforese de DNA genômico): A- Marcador de peso molecular I DNA/*Eco* RI ; B- *Ascaridia numidae*, C- *Shistosoma mansoni*; D- L3 de Cyathostominae;E- *Strongylus edentatus*, F- *S. equinus*; G- *S. vulgaris*, e H- *Caenorhabditis elegans*. PB- Pares de bases.

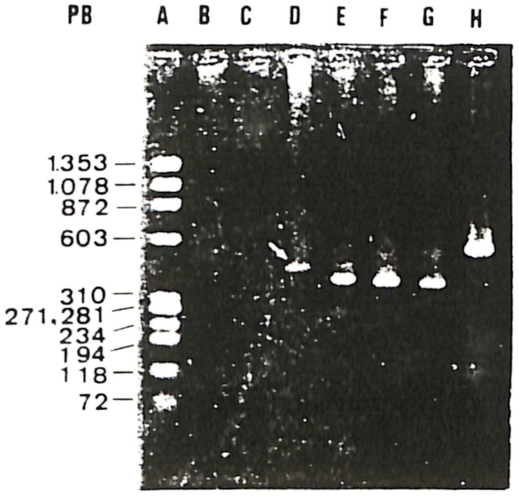

Figura 2 - (Eletroforese de produtos de PCR): A- Marcador de peso molecular fx 174 RF DNA/*Hae* III; B- *Ascaridia numidae*; C- *Shistosoma mansoni*; D- L3 de Cyathostominae;E- *Strongylus edentatus*; F- *S. equinus*; G- *S. vulgaris*, e H- *Caenorhabditis elegans*. PB- Pares de bases.

Dadas as mínimas variações em termos de peso molecular dos produtos amplificados a partir das seqüências ITS-2 de RDNA para as três espécies pertencentes ao gênero *Strongylus*, as perspectivas de aplicabilidade desta metodologia para a análise espécie-específica quer seja de vermes adultos, ovos ou larvas possivelmente implicará no emprego da análise da extensão do polimorfismo dos fragmentos de DNA, obtidos pela digestão dos produtos de PCR, com enzimas de restrição (RFLP-PCR) (GASSER *et alii*, 1994).

Em adição, a clonagem e o sequenciamento de possíveis seqüências repetitivas de DNA com a elaboração de novos "primers" para serem utilizados em reações de PCR, poderá se revelar numa ferramenta promissora para identificação rápida e precisa de *Strongylus spp.*, uma vez que as já definidas não apresentam especificidade quanto aos gêneros de estrongilideos estudados.

SUMMARY

In the present study the second internal transcribed spacer (ITS-2) of the ribosomal DNA from *Strongylus spp.* was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Comparisons were established for the amplification products from related organisms aiming to developed a methodology that might allow a specific diagnosis of these nematode parasites. The amplification of genomic DNA from adult worms and larvae with primers based on the ITS-2 sequence from *Caenorhabditis elegans* resulted in products with 240 base pairs. No DNA amplification was observed when genomic DNAs from *Schistosoma mansoni* and *Ascaridia numidae*, organisms considered outgroups, were included. Our data reveal a potential application of this methodology for the diagnosis of these parasites, although additional studies will be needed towards the definition of species-specific primer sequences.

KEY WORDS: *Strongylus*, species identification, ITS-2, RFLP-PCR, Diagnosis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores e técnicos do Curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, aos Professores Milton Yamamura e Elena Mettifogo da UEL - PR, aos técnicos do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura por facultarem a obtenção dos nematóides utilizados neste estudo. Ao Dr. Carlos E. Winter da USP pelo fornecimento de DNA genômico de *C. elegans*. À Tecnica Érika Veríssimo Villela, da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela colaboração durante os procedimentos relativos a eletroforese das amostras.

REFERÊNCIAS

BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. & CONCORDET, D. (1983). Identification of infective larvae of some commom nematode strongylids of horses. *Revue de Médicine Veterinaire* 144(12): 989-995.

CAMPBELL, A. J. D.; GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of Strongylus species alllows identification of single eggs. *International Journal for Parasitology*, 25 (3): 359 -365.

DAME, J. B.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H. & LINDGREN, G. (1991). Cloning and characterization of the ribosomal RNA gene repeat from *Ostertagia ostertagi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45: 275 - 280.

ELLIS, R. E.; SULSTON, J. E. & COULSON, A. R. (1986). The rDNA of C. elegans: sequence and struture. *Nucleic Acids Research* 14: 2345-2364.

GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H & STEVENSEN, L. A. (1994). Species identification of Trichostrongyle nematodes by PCR-Linked RFLP. *International Journal for Parasitology*, 24 (2): 291 - 293.

GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H. & BEVERIDGE, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, 21 (10): 2525 - 2526.

GORDON, H. MCL & WHITLOCK, A. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council Scientific Industrial Research Australia*, 12 (1): 50 - 59.

HERD, R. P. (1990). The changing world of worms: The size of the cyathostomes and the decline of *Strongylus vulgaris*. *Compendium for Continual Education Practical Veterinary*, 12: 732 - 736.

HOSTE, H.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. & BEVERIDGE, I. (1995). Differences in the Second Internal Transcribed Spacer (Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *International Journal for Parasitology*, 25 (1): 75 - 80.

LICHTENFELS, J. R. (1975). Helminths of domestic equids. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 42: special issue: 92 pp.

MCGRAW, B.M. & SLOCOMBE, J.O.F. Strongylus vulgaris in the horse: A review. *Canadian Veterinary Journal* 17(6):150-157. 1976.

NICHOL, C. & MASTERSON, W. J. (1987). Caracterisation of surface antigens of Strongylus vulgaris of potencial immunodiagnostic importance. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 56: 323 - 328.

ROBERT'S, F. H. S. & O'SULLLIVAN, P. J. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infectig the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1 (1): 99 - 102.

RODRIGUES, M. L. A.; SOUTO-MAIOR, M. P.; ANJOS, D. H. S. & OLIVEIRA, M. D. L. (1995). Comparação entre técnicas de McMaster e centrifugo flutuação para contagem de ovos de helmintos intestinais de eqüinos. *Revista da Universidade Rural*, série Ciências da Vida 17 (2): 101-102.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

SOULE, C.(1990). Update on the serological diagnosis of parasitoses in horses. *Pratique Vétérinaire Equine* 21: 7 - 10.

SOULSBY, E. J. L. (1982). Helminths, arthropods & of domesticated animals. 7th Edition, William & Wilkins Co., Baltimore, XIV+824p.

STEVENSON, L. A.; CHILTON, N. B. & GASSER, R. B. (1995). Differentiation of Haemonchus placei from H. contortus (Nematoda: Trichostrongylidae) by the Ribosomal DNA Second Internal Transcribed Spacer. *International Journal for Parasitology*, 25 (4): 483 - 488.

ZARLENGA, D. S.; LICHTENFELS, J. R. & STRINGFELLOW, F. (1994)Cloning and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from *Nematodirus battus*. *Journal of Parasitology*, 80 (2): 342-344.

(Received 01 November 1996, Accepted 06 March 1997)